

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE
QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención de título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
NATURALEZA ESTEROIDEA PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL Y
EXTRACTOS ETANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE LA ESPECIE
Clinopodium tomentosum (Kunth) Govaerts (Lamiaceae)**

**AUTORA:
ALEXANDRA ELIZABETH MONCAYO MIÑO**

**TUTOR:
PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA**

Quito, febrero de 2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo/Nosotros Alexandra Elizabeth Moncayo Miño, con documento de identificación N° 1714735816, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy/somos autor/es del trabajo de grado/titulación intitulado: “CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE NATURALEZA ESTEROIDEA PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTOS ETANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE LA ESPECIE *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts (Lamiaceae)”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor/es me/nos reservo/reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Alexandra Elizabeth Moncayo Miño

Cédula: 1714735816

Fecha: 14 de febrero de 2020

DECLARATORIA DE COAUTORÍA DEL DOCENTE TUTOR

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE NATURALEZA ESTEROIDEA PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTOS ETANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE LA ESPECIE *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts (Lamiaceae), realizado por Alexandra Elizabeth Moncayo Miño, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, 14 de febrero de 2020



Paco Fernando Noriega Rivera

0602421323

Dedicatoria

A los pilares de mi familia, mis abuelos Aidita, Paquito, Berthita y Homerito. Gracias por enseñarme que el amor, la pasión y la perseverancia son la fórmula que permite alcanzar el éxito.

A mis padres Marco y Mónica, quienes, con su apoyo, paciencia y amor, me han dado la fortaleza para culminar esta etapa de mi vida. Gracias por tanto papitos, por levantarme de cada caída y brindarme su mano, sin ustedes mi vida no sería nada. Todo esto es para ustedes y por ustedes. Les amo mucho.

A Marco y Ana gracias por tanto cariño, comprensión, apoyo y felicidad. Gracias por recibirme en Madrid y permitirme lograr esta meta, les quiero mucho.

A Julieta por ser una luz en el camino, por brindar sonrisas y amor a pesar de la distancia. Gracias por cambiar completamente mi vida.

A Chelsea, que me brindó tanto cariño y felicidad durante 15 años de mi vida. Este logro es para ti mi angelito.

A Lolita, quien estuvo presente en cada etapa de mi vida. Te quiero mucho

A toda mi gran familia, cada uno aportó en su momento algo importante, tanto sentimental como profesionalmente.

A Ari, quien es mi compañera de alegrías y tristezas, de locuras y tranquilidad. Gracias por ser como eres y darme siempre los mejores consejos. Te amo mucho prima hermana menor.

A Edi, quien llegó a mi vida y la transformó con su cariño y amor. Gracias por tantas enseñanzas, confianza y oportunidades. Has permitido que cumpla este logro gracias a ese apoyo incondicional que solo tú puedes dar. Le pido a la vida que me permita cumplir muchos más logros junto a ti. Te amo demasiado.

Agradecimiento

A la Universidad Politécnica Salesiana y a los docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, por todas las enseñanzas impartidas.

A mi tutor, Paco Noriega, por brindar los conocimientos y el apoyo necesario para la culminación de este trabajo de titulación.

A todo el personal que forma parte de los Laboratorios de Ciencias de la Vida por permitirme desarrollar de forma adecuada este trabajo de titulación.

A Christine Chemin y todo el equipo de Aromavida, gracias por abrir sus puertas para permitirme comenzar una vida profesional junto a ustedes.

A todos quienes apoyaron de una u otra forma este trabajo de titulación, mil gracias.

Resumen

En la presente investigación fueron identificadas moléculas esteroideas en diversos extractos provenientes de la especie *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts. Tanto en los extractos etanólicos, clorofórmicos y en los aceites esenciales se pudo cuantificar y cualificar esteroides. Los ensayos se hicieron de forma cuantitativa empleando metodologías espectrofotométricas en extractos con los siguientes resultados: extracto clorofórmico de flores 9.23 ± 0.01 mg/g droga; extracto etanólico de flores 17.04 ± 0.06 mg/g droga; extracto clorofórmico de partes aéreas 7.15 ± 0.02 mg/g droga; extracto etanólico de partes aéreas 17.49 ± 0.17 mg/g droga. El contenido de esteroides fue determinado en tres aceites esenciales provenientes de diversas partes de la planta, empleando la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se logró identificar la naturaleza de una molécula esteroidea que fue identificada como un derivado del androstano (C_{21}), un precursor de fitoesteroides, cuyos resultados en los diferentes aceites fueron los siguientes: en flores se cuantificó un 0.87 ± 0.09 %, en partes aéreas 0.5 ± 0.0 % y en hojas 0 ± 0.00 %. La naturaleza específica de la molécula se encuentra en verificación con técnicas espectrométricas de mayor resolución. Toda esta investigación justifica el uso tradicional de la especie, de la cual se emplean preparados a partir de sus flores para incrementar las contracciones uterinas en el momento de la labor del parto, por los pueblos ancestrales de la región interandina del Ecuador y de esta manera contribuir a la verificación de este conocimiento mediante procesos de investigación científica.

Palabras clave: *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts, fitoesteroides, androstano.

Abstract

In this study, steroid molecules were identified in extracts from the *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts species. In both the ethanolic, chloroform extracts and in the essential oils, sterols could be quantified and qualified. The tests were done quantitatively using spectrophotometric methodologies, in the ethanolic and chloroform extracts with the following results: chloroform extract of flowers 9.23 ± 0.01 mg/g drug; ethanolic extract of flowers 17.04 ± 0.06 mg/g drug; chloroform extract of aerial parts 7.15 ± 0.02 mg/g drug; ethanolic extract of aerial parts 17.49 ± 0.17 mg/g drug. The sterols content was determined in three essential oils from various parts of the plant, using the gas chromatography technique coupled to mass spectrometry, it was possible to identify the nature of a steroid molecule that was identified as a derivative of androstane (C₂₁), a precursor of phytosterols, whose results in the different oils were: 0.87 ± 0.09 % was quantified in flowers, 0.5 ± 0.0 % in aerial parts and 0 ± 0.00 % in leaves. The specific nature of the molecule is in verification with higher resolution spectrometric techniques. This investigation justifies the traditional use of the species, of which preparations are used from its flowers to increase uterine contractions at the time of labor, by the ancestral communities of the inter-Andean region of Ecuador and in this way to contribute the verification of this knowledge through scientific research processes.

Keywords: *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts, phytosterols, androstane.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.....	4
Marco conceptual.....	4
1.1. Botánica y ecología de la especie.....	4
1.1.3. Especie <i>Clinopodium tomentosum</i> (Kunth) Govaerts.....	5
1.2. Usos ancestrales.....	6
1.3. Estudios científicos previos.....	7
1.4. Aceite esencial.....	10
1.4.1. Métodos de extracción de aceites esenciales.....	12
1.5. Extractos	13
1.5.1. Metodologías usadas para la obtención de extractos	14
1.5.2. Solventes usados en la extracción de metabolitos	15
1.6. Metabolitos vegetales	16
1.6.1. Moléculas esteroideas.....	17
1.6.1.1. Fitohormonas esteroideas análogas a las hormonas de mamíferos	18
1.6.2. Técnicas de detección de moléculas esteroideas	19
Capítulo 2.....	22
Metodología	22

2.1. Recolección del material vegetal	22
2.2. Obtención de extractos etanólico y clorofórmico	22
2.3. Extracción de aceite esencial	23
2.4. Cuantificación de Esteroides Totales	24
2.5. Separación e identificación de estructuras químicas por técnicas cromatográficas	26
2.5.1. Identificación de los componentes químicos del aceite esencial por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	26
2.5.2 Identificación de los componentes químicos de extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	28
2.6. Diseño experimental.....	29
Capítulo 3.....	30
Resultados y discusión	30
3.1 Extracción de aceite esencial	30
3.2 Composición química de aceites esenciales.....	31
3.3. Cuantificación de Esteroides Totales	41
3.4. Identificación de los componentes químicos de extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	45
Conclusiones	48
Recomendación.....	49
Anexos	63

Índice de Tablas

Tabla 1 Taxonomía de la especie <i>Clinopodium tomentosum</i> (Kunth) Govaerts.....	6
Tabla 2. Métodos de extracción de aceite esencial.	12
Tabla 3. Técnicas de extracción.	14
Tabla 4. Grupo de moléculas esteroideas vegetales.	20
Tabla 5. Diseño experimental.....	29
Tabla 6. Rendimiento de aceites esenciales por parte vegetal.	30
Tabla 7. Composición química de los aceites esenciales de hojas, flores y partes aéreas de <i>Clinopodium tomentosum</i> analizados por GC/MS.	33
Tabla 8. Concentración de esteroides totales en extractos.	42
Tabla 9. Resultados de análisis de varianza de dos vías.	43
Tabla 10. Prueba de Tukey.....	44

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Clinopodium tomentosum</i> (Kunth) Govaerts.	5
Figura 2. Esqueleto de moléculas esteroideas.....	17
Figura 3. Dilución de extractos.	25
Figura 4. Reacción Liebermann- Burchard.	26
Figura 5. Composición química de aceites esenciales de <i>C. tomentosum</i>	32
Figura 6 Componentes principales de <i>C. tomentosum</i>	37
Figura 7. Acetato de dehidroepiandrosterona.	38
Figura 8. .Síntesis de Acetato de Dehidroepiandroesterona.	40
Figura 9. Curva de calibración.	41
Figura 10. Concentración de esteroides totales.....	42
Figura 11: Cromatografía de capa fina.	45
Figura 12. Derivatización con Liebermann-Burchard.	46

Índice de Anexos

Anexo 1. Recolección de <i>Clinopodium tomentosum</i>	63
Anexo 2. Triturado de partes vegetales para preparación de extracto	64
Anexo 3. Humectación de la droga vegetal	65
Anexo 4. Percolador.....	66
Anexo 5. Filtración de extracto.....	67
Anexo 6. Obtención de aceite esencial en destilador con trampa Clevenger	68
Anexo 7 Vial ámbar ANSI-48 de 2mL para almacenamiento de aceite esencial.....	69
Anexo 8 Estándares de colesterol.	70
Anexo 9. Aplicador automático Linomat 5.....	71
Anexo 10. Inyección de extractos en placas cromatográficas	72
Anexo 11. Elución de placas cromatográficas.	73
Anexo 12. Aceite esencial obtenido.....	74
Anexo 13. Cromatograma del aceite esencial de Partes aéreas de <i>Clinopodium tomentosum</i>	75
Anexo 14. Cromatograma del aceite esencial de hojas de <i>Clinopodium tomentosum</i>	76
Anexo 15. Cromatograma del aceite esencial de flores de <i>Clinopodium tomentosum</i>	77
Anexo 16. Espectro de masas de Acetato de dehidroepiandrosterona.....	78
Anexo 17 Polaridad de Solventes	79

Anexo 18. Derivatización de extracto etanólico de flores con Liebermann-Burchard	
.....	80

Introducción

El Ecuador es considerado como uno de los 17 países megadiversos del mundo, gracias a la variabilidad de factores climáticos y geográficos presentes en sus cuatro regiones, el país cuenta con la cifra más alta de flora y fauna de la tierra por unidad de superficie. Aquí se encuentra el 10 % de las especies vegetales del planeta y dentro de esta cifra se considera que el 58 % de las familias de plantas en el país son endémicas, esta biodiversidad hace del Ecuador un lugar ideal, para la investigación no solo de nuevas especies vegetales, sino también de sus metabolitos secundarios (Bravo-Velásquez, 2014; INABIO, 2017; Malagón *et al.*, 2016). Dentro de los múltiples usos que se le da a la gran cantidad de plantas presentes en el país, es importante mencionar que en su mayoría, las especies vegetales son utilizadas con fines etnofarmacéuticos, se considera que del 70 al 95 % de la población usa plantas medicinales como forma primaria de atención de la salud, esto gracias a los saberes ancestrales de las diversas culturas del país, los cuales se han mantenido a través de generaciones gracias a la introducción temprana de habilidades tradicionales que como citan varios autores, ocurren antes de los quince años en algunas comunidades (Lucía De la Torre, Alarcón, Kvist, & Salazar, 2008; Hart *et al.*, 2017; Luzuriaga-Quichimbo, Hernández del Barco, Blanco-Salas, Cerón-Martínez, & Ruiz-Téllez, 2018; Weckmüller, Barriocanal, Maneja, & Boada, 2019).

A pesar del gran conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales, y el creciente interés de la comunidad científica por sus principios activos, la investigación de la composición química de gran parte de las especies es insuficiente, por lo cual, no se puede contrastar información, ni obtener un fundamento científico que valide el manejo tradicional, dejando así, una amplia brecha de conocimiento que debe ser explorada por los investigadores ecuatorianos, con el fin de aprovechar los recursos

que nos brinda nuestra nación (M. Vera, Naranjo, Malafronte, & Braca, 2014; Weckmüller *et al.*, 2019).

Clinopodium tomentosum, conocida comúnmente como Tiglán, Pumín o Santa María, es una especie endémica de los Andes Ecuatorianos. El uso de sus flores, hojas y tallos es principalmente medicinal, ya que, se ha reportado que es utilizada a manera de infusión como agente antiinflamatorio (M. B. Vera, Naranjo, Malafronte, & Braca, 2014). También se indica el uso de sus flores para el tratamiento de infecciones gastrointestinales (Ansaloni *et al.*, 2010) y se destaca el uso de esta especie como acelerador de la labor de parto (Noriega & Taxo, 2018), siendo este último, el principal factor de interés para estudiar su composición química, puesto que sería un indicador de la presencia de moléculas esteroideas.

Existen algunos estudios previos que permitirían confirmar la presencia de esteroides en el perfil químico de la especie, como la investigación realizada por Tubon y otros en 2017, en el cual se estudió el efecto del extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum* sobre la estabilidad de células endoteliales aórticas porcinas (pAEC por sus siglas en inglés), determinando que esta especie muestra una clara propiedad proangiogenética, debido a que su extracto indujo la formación de una red capilar a partir de pAEC sembradas en una matriz polimerizada. Esto sería un indicador de la presencia de esteroides en la especie, puesto que como mencionan Chetta y Olivieri (2012), la actividad proangiogenética se ve dada por la acción de esteroides, como sucede en la remodelación vascular en las vías respiratorias en casos de asma, en donde, el esteroide inhalado actuará en los factores proangiogenéticos.

La presente investigación tiene como objetivo general caracterizar los metabolitos secundarios de naturaleza esteroidea presentes en el aceite esencial y extractos etanólico y clorofórmico de la especie *Clinopodium tomentosum* (Kunth), mientras que

sus objetivos secundarios son los siguientes: Preparar extractos etanólico y clorofórmico empleando las partes áreas de la planta *Clinopodium tomentosum* (Kunth); Extraer el aceite esencial de las partes aéreas de la planta *Clinopodium tomentosum* (Kunth) mediante destilación por arrastre de vapor; Cuantificar la concentración de esteroides totales presentes en los extractos etanólico y clorofórmico provenientes *Clinopodium tomentosum* (Kunth) por métodos espectrofotométricos; Verificar las diversas estructuras químicas de los esteroides presentes en los extractos etanólico y clorofórmico de *Clinopodium tomentosum* (Kunth), mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La hipótesis alternativa para este estudio es: La especie *Clinopodium tomentosum* presenta una cantidad significativa de diversas moléculas de naturaleza esteroidea en su aceite esencial y extractos etanólico y clorofórmico, mientras que la hipótesis nula es: La especie *Clinopodium tomentosum* no presenta moléculas de naturaleza esteroidea en su aceite esencial y extractos etanólico y clorofórmico.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1. Botánica y ecología de la especie

1.1.1. Familia Lamiaceae

La Familia Lamiaceae se considera como la sexta familia de plantas florales más grande, con un aproximado de 7500 especies, organizadas en 236 géneros, incluyendo todo tipo de plantas herbales, arbustivas y árboles. Tiene una distribución cosmopolita, sin embargo, crece principalmente en el continente americano y en las regiones mediterráneas. En América se encuentran 65 géneros, que se encuentran principalmente en las zonas tropicales de Centroamérica, y en zonas andinas y amazónicas de Sudamérica. Esta familia de especies vegetales cuenta con una gran facilidad de adaptación y cultivo, motivo por el cual, es muy común encontrarlas en estudios etnobotánicos y etnofarmacéuticos que confirman sus aplicaciones medicinales, biológicas, cosméticas e industriales en múltiples culturas y tradiciones del planeta. Históricamente las plantas de esta familia han sido reportadas para el tratamiento de una serie de condiciones como alergias cutáneas, asma, cansancio, depresión, problemas gastrointestinales, fiebre, entre otros. La Organización Mundial de la Salud, considera que el uso de algunas especies representativas de esta familia, cuyas actividades biológicas y efectos terapéuticos han sido confirmados, deben ser tomadas en cuenta para el tratamiento de nuevas y diferentes enfermedades (Bekut *et al.*, 2018; Mesquita *et al.*, 2019; Sim, Abd Rani, & Husain, 2019; Vázquez *et al.*, 2014).

1.1.2. Género *Clinopodium*

El género *Clinopodium* está constituido por plantas herbáceas y arbustivas aromáticas, las mismas que se encuentran distribuidas a nivel global con más de 140 especies, las cuales pertenecen al continente Europeo en su mayoría, sin embargo han sido

identificadas algunas especies en África, Asia tropical e Indomalasia. Se considera que en América se pueden encontrar 50 especies correspondientes a este género. En el País destacan algunas especies ubicadas entre los 1500- 3000 m.s.n.m se encuentran ubicadas principalmente en la zona Andina, sin embargo, algunas pueden ser ubicadas en la región costa como *Clinopodium taxifolium* o en la región amazónica como *Clinopodium tomentosum* (Harley & Paucar, 2000; Morocho *et al.*, 2018; Romani *et al.*, 2019; Vázquez *et al.*, 2014).

1.1.3. Especie *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts

Clinopodium tomentosum (Kunth) Govaerts



Figura 1. Partes aéreas de la especie *Clinopodium tomentosum*

Fuente: (Noriega & Taxo, 2018)

Esta especie es considerada como endémica del Ecuador, se conoce comúnmente como “Tiglán”, “Santa María” o “Pumín”. Es una planta leñosa que alcanza una altura de 30-80 cm, presenta flores amarillas-anaranjadas y hojas pequeñas (Figura 1) (M. Vera, 2015). Esta especie se encuentra ubicada en las provincias de Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Pastaza, Pichincha y Tungurahua (P. Noriega & Taxo, 2018; Romani *et al.*, 2019; M. Vera, 2015).

La taxonomía de la especie se detalla a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Taxonomía de la especie *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	<i>Nepetoideae</i>
Tribu	<i>Menthae</i>
Subtribu	<i>Menthinae</i>
Género	<i>Clinopodium</i>
Especie	<i>Clinopodium tomentosum</i>

Elaborado por: La autora, 2019

Fuente: (Culqui, 2017; P. Noriega & Taxo, 2018; Vázquez et al., 2014)

1.2. Usos ancestrales

En cuanto al género, cabe destacar su amplia gama de usos medicinales, por ejemplo, en México, *Clinopodium mexicanum*, es utilizada para calmar afecciones nerviosas, inducir el sueño y como calmante (Estrada-Reyes, Martínez-Vázquez, Gallegos-Solís, Heinze, & Moreno, 2010). En Pakistán, el polvo de las especies *Clinopodium umbrosum* y *Clinopodium vulgare* es aplicado en heridas, hemorragias y afecciones cardíacas (Khan & Khatoon, 2008). En Palestina, *Clinopodium serpyllifolium*, es utilizada como infusión para tratar diabetes, hipertensión, inflamaciones de diversos tipos (Ali-Shtayeh et al., 2018). En Bolivia y Argentina la especie *Clinopodium odorum* es conocida por su capacidad laxante, carminativa, diurética, además de aplicarse para tratar los diversos tipos de dolor de estómago, cólicos y dolores de cabeza (Vázquez et al., 2014).

En Ecuador, el uso de *Clinopodium nubigenum* se da principalmente por las comunidades de la zona andina, para el tratamiento de los síntomas de la gripe,

desordenes digestivos y síntomas asociados a la menstruación (Bedini *et al.*, 2019). En cuanto a la especie *Clinopodium taxifolium*, ubicada al sur del país, cabe destacar su uso como infusión para el tratamiento de inflamaciones internas, flatulencia, dolor de estómago, malaria y tos (Morochó *et al.*, 2018). El uso de las flores, hojas y tallos de *Clinopodium tomentosum* es principalmente medicinal, puesto que, es utilizada a manera de infusión como agente antiinflamatorio y como antiséptico oral (Vera *et al.*, 2014). También se reporta el uso de sus flores para el tratamiento de infecciones gastrointestinales (Ansaloni *et al.*, 2010). Noriega y Taxo (2018), mencionan el uso de esta especie como acelerador de la labor de parto.

1.3. Estudios científicos previos

En cuanto a estudios previos, se puede destacar el trabajo realizado por Benzo y otros en 2007, en el cual se identificó el umbral de la detección del olor de algunos componentes seleccionados del aceite esencial de *Clinopodium tomentosum* mediante un olfatómetro acoplado a un cromatógrafo de gases, el cual permite a la nariz humana detectar el olor de los compuestos por separado, mientras el cromatógrafo los va detectando, de esta manera se analizaron los componentes pulegona, 1,8 cineol y (R)-(+)-limoneno, mediante olfatometría de dilución dinámica, en la cual se preparan soluciones estándares de los compuestos y se comparan con el aceite esencial. Esto fue realizado a través de cuatro panelistas, quienes tuvieron similitudes en la detección de estos compuestos. En este estudio también se caracterizó la composición del aceite esencial de esta especie, a través de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, en la composición se encuentra gran cantidad de monoterpenos, siendo, iso-mentona y pulegona los más abundantes con 41.7 % y 29.9 % respectivamente.

En otro estudio realizado en 2014, Vera y otros, determinaron la presencia de compuestos fenólicos en extractos de *Clinopodium tomentosum*, destacando la presencia de un nuevo compuesto (2-O-benzoil-3-O ácido tartárico cinnamomyl) y once compuestos ya conocidos. Los extractos de hojas de *Clinopodium tomentosum* fueron preparados con cloroformo-metanol, hexano y metanol como solventes, para luego someter a los mismos a cromatografía de columna y cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa.

Tubon y otros en 2017, estudiaron el efecto del extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum* sobre la estabilidad de células endoteliales aórticas porcinas, identificando la propiedad proangiogénica de la especie, gracias a la formación de una red capilar de las células.

Otro estudio de interés, confirma la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum* a una concentración de 100 y 300 mg/kg. La evaluación de la actividad antiinflamatoria se realizó mediante la inducción de edema plantar por carragenina al 1 %; con los animales de experimentación (*Rattus norvegicus*). La administración del extracto fue por vía oral con su vehículo respectivo por medio de una cánula que llevó al extracto aproximarse al estómago de la rata, obteniendo una reducción de la inflamación aproximada del 50 %, siendo esta similar al grupo control cuya reducción fue de un 52 % (Culqui, 2017).

Finalmente, Romani y otros en 2019, estudiaron la capacidad insecticida de dos especies del género: *Clinopodium tomentosum* y *Clinopodium nubigenum*. Aquí evaluaron la composición química de los aceites esenciales, determinando que, el componente mayoritario para *Clinopodium tomentosum* es la isomentona (45 %), mientras que para *Clinopodium nubigenum*, es el carvacrol (33 %). Además, se estudió el comportamiento de *Sitophylus zeamais* ante los aceites esenciales, esto se realizó en

tres cámaras consideradas como un estadio de aire quieto, en donde se colocaron diferentes concentraciones de aceite esencial en un papel filtro ubicado en el techo de la cámara de prueba, mientras que las cámaras control no contenían aceite esencial. Al analizar el tiempo de estadía del insecto en las diferentes cámaras se pudo establecer la fuerte actividad repelente de los aceites, siendo *Clinopodium tomentosum* el aceite con mejor actividad, puesto que presenta una concentración repelente media (RC₅₀) de 6.759 $\mu\text{L L}^{-1}$ aire, mientras que *Clinopodium nubigenum* tiene una RC₅₀ de 11.216 $\mu\text{L L}^{-1}$ aire, siendo así *Clinopodium tomentosum* doblemente eficaz sobre *Clinopodium nubigenum*.

Además, estudios realizados sobre especies de este género han permitido obtener información de alta importancia, en cuanto a la actividad biológica, por ejemplo se ha determinado que *Clinopodium bolivianum*, presenta una alta capacidad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, defendiendo de esta manera las células epiteliales de la vejiga y previniendo infecciones urogenitales (Mohanty *et al.*, 2017). En la especie *Clinopodium taxifolium* se identificó la actividad antibacteriana de sus extractos hexanólico y metanólico ante *Klebsiella pneumoniae*. Además se evaluó la actividad hipoglucemiante de esta especie mediante la inhibición in vitro de α -glucosidasa, el análisis determinó que el extracto de acetato etílico tiene la mejor actividad inhibitoria con una concentración de inhibición media (IC₅₀) de 24 $\mu\text{g/mL}$ (Morocho *et al.*, 2018). Varios estudios han confirmado la presencia de esteroides tanto en el género *Clinopodium* como en la familia Lamiaceae, a la cual este género pertenece. Rai, Pai, y Kedilaya (2016), demostraron la presencia de fitoesteroides en varios extractos obtenidos a partir de hojas de diversas especies de la familia Lamiaceae. De la misma manera, Magesh y otros, determinaron en 2015 la presencia de esteroides en tres tipos de extractos realizados con hojas de tres especies de la familia Lamiaceae. Por otra

parte, varios autores utilizan toda la planta como material vegetal para la preparación de los extractos, por ejemplo, Jayakumari y Ravichandiran (2017), detectaron esteroides a partir del extracto hexanólico de la especie *Leucas cephalotes*, también se destaca el trabajo realizado por Rondón y otros en 2015, donde los esteroides fueron obtenidos del extracto etanólico de la especie *Aeghiphila alba*.

Brodkiewicz y otros, establecieron (2018) la presencia de compuestos esteroideos en la especie *Clinopodium gilliesi*. También se han encontrado principios activos esteroideos en especies como *Clinopodium gracile* (Chen, Liu, Zhou, & Liu, 2013) y *Clinopodium urticifolium* (Wei, Cheng, Cheng, & Gao, 2004).

1.4. Aceite esencial

El aceite esencial de una especie vegetal es definido por la Farmacopea Europea Octava edición como: “Producto oloroso, generalmente de composición compleja, obtenido de una materia prima vegetal botánicamente definida, ya sea mediante destilación por arrastre de vapor, destilación seca o un método mecánico apropiado sin calentamiento.” Los aceites esenciales son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa encontradas en gran cantidad de especies vegetales, son muy numerosos y están ampliamente distribuidos en distintas partes del mismo vegetal: en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Council of Europe, 2013; Hashemi, Khaneghah, & Sant’Ana, 2018).

Las plantas producen aceite esencial como metabolitos secundarios generados a manera de respuesta a estrés fisiológico, ataques químicos y factores ecológicos. Estos principios activos se producen mediante dos tipos de glándulas secretoras: aquellas localizadas en la superficie de la planta (secreción exógena) y aquellas localizadas en los tejidos internos (secreción endógena). Los aceites esenciales puros, representan de un 0.1 a 1 % del peso total de una especie vegetal y se encuentran constituidos por

aproximadamente 200 compuestos, entre los cuales se puede encontrar alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, terpenos, flavonoides, esteroides y otras moléculas que cumplen una función o actividad biológica específica ya sea individualmente o en conjunto. Los aceites esenciales son un recurso natural potencial para la utilización en diferentes industrias, como la farmacéutica, cosmética y alimentaria (Asbahani *et al.*, 2015; Giacometti *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2018; Rivas, Oranday, & Verde, 2016; Yan-Fei, Ren, Liu, Lai, & Ma, 2015).

El interés industrial de los aceites esenciales viene dado por su diversa actividad biológica, siendo las más representativas: antioxidante, antimicrobiana, antiviral y antitumoral (Giacometti *et al.*, 2018). Los componentes antioxidantes son valorados debido a que restauran el equilibrio oxidativo fisiológico del organismo, protegiendo así la salud humana. Estos componentes son altamente útiles en la industria, pues neutralizan radicales libres y previenen la oxidación de materias primas. Al utilizar aceites esenciales, se asegura que los compuestos antioxidantes mejoren la calidad del producto terminado y a su vez lo vuelvan más seguro, en comparación a un producto que utiliza antioxidantes de naturaleza química (Ashokkumar, Murugan, Dhanya, & Warkentin, 2020; Giacometti *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020).

El desempeño citotóxico de los aceites esenciales, permite que afecte a estructuras celulares de múltiples patógenos, pues al tener naturaleza lipofílica, estos metabolitos secundarios tienen la capacidad de ingresar a las células dañando su estructura, lo que causará la muerte celular, por este motivo, se han generado múltiples productos con aceites esenciales para el control de microorganismos como bacterias y hongos en comida, cosméticos y medicamentos. En cuanto a bacterias es importante mencionar que los aceites esenciales son capaces de combatir tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, que son consideradas peligrosas para humanos, plantas, animales y

comida. En cuanto a su actividad antifúngica cabe destacar su uso ante patógenos responsables de infecciones fúngicas que afectan al cabello, uñas y piel. Además al ser antimicrobianos, los aceites esenciales son considerados útiles para el tratamiento de enfermedades respiratorias, y gastrointestinales, la farmacopea europea considera más de 25 aceites que pueden ser usados para la disminución de síntomas (Calvo-Irabien, 2018; Horváth & Ács, 2015; Lang & Buchbauer, 2012).

1.4.1. Métodos de extracción de aceites esenciales

La extracción se realiza a partir de materia prima vegetal mediante algunos métodos de extracción, mismos que se clasifican en dos categorías: Métodos convencionales o clásicos y métodos innovadores.

Tabla 2.

Métodos de extracción de aceite esencial.

Nombre	Muestra	Tiempo	Desventajas	Ventajas
<i>Hidrodestilación o destilación por arrastre de vapor</i>	>1000 L	Alto	Limitado por temperatura	Se puede realizar a gran escala
<i>Microondas</i>	500 L	Bajo	Varios puntos de riesgo	Disrupción celular
<i>Ultrasonido</i>	600 L	Bajo	Problemas para separar el aceite	Alta disrupción celular
<i>Extracción con fluidos súper críticos</i>	300 L	Medio	Necesidad de capacitación continua	Aumenta el rendimiento

Elaborado por: La autora, 2019

Fuente: (Hashemi *et al.*, 2018)

Dentro de los métodos clásicos se encuentran técnicas como la hidrodestilación, arrastre por vapor, hidrodifusión, extracción con solventes orgánicos, entre otros. En cuanto a las técnicas innovadoras utilizadas para la extracción del aceite esencial, se debe resaltar la extracción por fluidos supercríticos, extracción con CO₂, la extracción asistida mediante ultrasonido, la extracción asistida por microondas (Asbahani *et al.*, 2015), estas últimas presentan ventajas con respecto a las técnicas tradicionales puesto

que, son considerados como procesos rápidos, eficientes y relativamente económicos (León, Osorio, & Martínez, 2015). En la tabla 2 se mencionan características de diferentes métodos de obtención de aceite esencial.

1.5. Extractos

Los extractos son preparaciones de consistencia líquida, semi-sólida o sólida obtenidos a partir de material vegetal o animal, mismos que se utilizan usualmente en un estado seco. Al hablar de extractos de consistencia líquida se debe mencionar a los extractos fluidos y las tinturas, mientras que, los extractos suaves y las oleorresinas conforman los extractos semi-sólidos y se considera que los extractos secos son aquellos de consistencia sólida (Council of Europe, 2013).

Se denomina extracción sólido- líquido al procedimiento en el cual un sólido triturado (material vegetal) se pone en contacto con un líquido (disolvente de extracción) en el que son solubles algunas sustancias que contiene el sólido. De este proceso se obtiene un sólido agotado y una disolución o extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas en el mismo. Este tipo de extracto, puede ser a su vez un extracto fluido, mismo que se caracteriza porque una parte de la masa o de su volumen es equivalente a una parte de la masa de la materia sólida utilizada (Council of Europe, 2013; Ortuño Sánchez, 2006).

Cuando se realizan extractos, se utilizan diversas partes de la planta de acuerdo a los antecedentes encontrados, siendo estas: raíz, hojas, flores, tallos o la planta completa. Para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, se recurrirá a métodos de extracción más complejos que permitan detectar o cuantificar principios activos (Rivas *et al.*, 2016).

1.5.1. Metodologías usadas para la obtención de extractos

En cuanto a las técnicas de extracción Rivas y otros (2016), mencionan que para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, se recurren a métodos de extracción complejos que permiten obtener métodos reproducibles con cuantificación de principios activos en lo posible. Existen tres técnicas de extracción, mismas que se ven reflejadas en la tabla 3.

Tabla 3.

Técnicas de extracción.

Técnica	Descripción
Maceración	El material vegetal se corta en pequeños trozos o se pulveriza, se coloca en recipientes adecuados y se añade el solvente seleccionado, la mezcla se mantiene en reposo o en un equipo con agitación continua a temperatura ambiente o con calefacción durante 5 días.
Percolación o lixiviación	El proceso inicia cuando se arma el percolador, se coloca un material filtrante y luego el material vegetal fresco con el solvente, se realiza un goteo controlado para liberar el primer menstuo y luego de un tiempo de reposo se decanta y se evapora el solvente en un Rotavapor o se utiliza el extracto directamente.
Soxhlet	Esta técnica es útil para la extracción sólido-líquida dónde el material sólido es colocado en la cámara principal del extractor Soxhlet y se hace pasar el solvente, este ciclo se puede repetir muchas veces durante horas o días. Las sustancias extraídas son metabolitos no volátiles.

Elaborado por: La autora, 2019

Fuente: (Rivas *et al.*, 2016)

1.5.2. Solventes usados en la extracción de metabolitos

La extracción por solución o mediante la utilización de solventes se realiza generalmente con disolventes orgánicos que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias que son evaporadas y concentradas a bajas temperaturas. Después se elimina el disolvente obteniendo la fracción deseada. La selección del disolvente pretende que el mismo sea capaz de disolver rápidamente todos los principios, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente, pero sin que esto conlleve a la pérdida de los metabolitos. Cabe destacar que también se pueden realizar extractos acuosos, estos se realizan con agua destilada, aplicando diversas técnicas de extracción (Arraiza, 2010).

Dentro de los solventes orgánicos se encuentra el etanol, mismo que es considerado como un solvente universal que permite extraer una amplia gama de principios activos, lo cual es de gran interés por parte de los investigadores al querer realizar un perfil fitoquímico completo que justifique la actividad biológica de la planta (Sharapin, Rocha, & Pinzón S., 2000). Además, los extractos etanólicos también son utilizados para la verificación de las actividades biológicas sugeridas de las especies estudiadas, como sucede en el estudio realizado por Qureshi y otros en 2017, donde el extracto etanólico de *Mentha piperita* tuvo mayor índice de mortalidad de *Culex quinquefasciatus* en su estadio larval en comparación con el extracto acuoso. Por otra parte, el cloroformo, es un solvente ampliamente usado debido a su polaridad. Es empleado en técnicas de cromatografía de capa fina tal como lo detalla Shriner (2013), quien al compararlo con otros solventes orgánicos según la polaridad creciente, pudo determinar que el cloroformo era útil en esta técnica. Esta polaridad se encuentra relacionada con la constante dieléctrica la cual es la medida de la capacidad de un

solvente para separar cargas iónicas, de esta manera un solvente con una constante dieléctrica alta es un solvente polar y al contrario con una constante baja es no polar. Al ser polar, permite la extracción de una amplia cantidad de principios activos, permitiendo obtener esteroides en alta cantidad como lo señalan Rai y otros (2013), quienes cuantificaron mayor cantidad de esteroides en el extracto clorofórmico de cuatro especies correspondientes a la familia Lamiaceae, en comparación con extractos etanólico y metanólico.

1.6. Metabolitos vegetales

Las plantas tienen una diversidad de compuestos que se producen en varias rutas metabólicas. Estos compuestos, se los clasifica en dos grupos: metabolitos primarios y secundarios. Los productos del metabolismo primario son aquellos indispensables para el crecimiento de la planta, estos son las proteínas, los ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos (Castillo García & Martínez Solís, 2007; Stashenko & René Martínez, 2019).

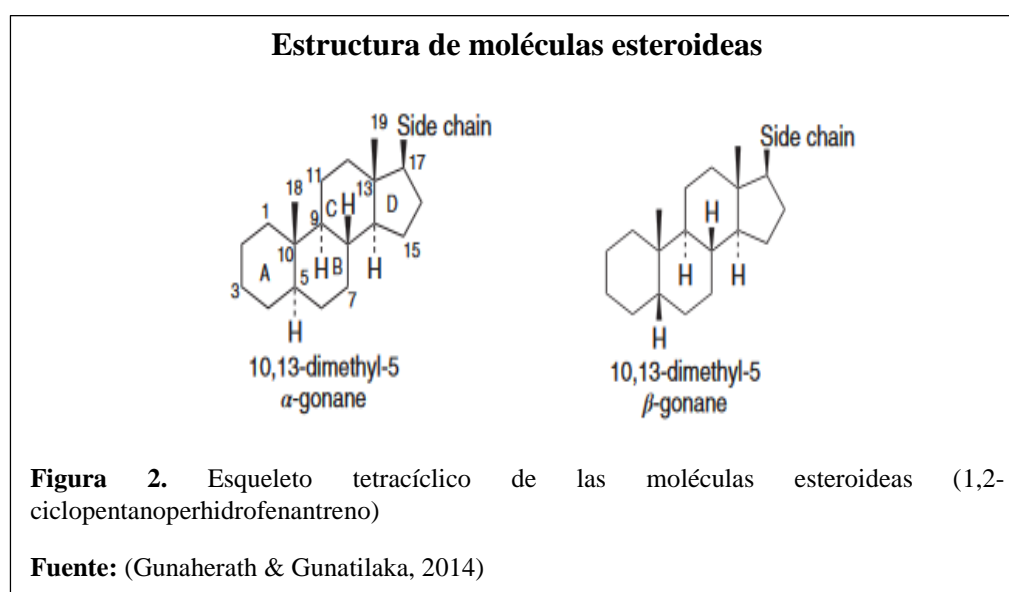
Por otra parte, se encuentran los metabolitos secundarios que presentan diversas funciones. Taiz y Zeiger (2006), mencionan que estos metabolitos actúan como defensa ante depredadores y microorganismos patógenos, son soporte estructural como la lignina o dan características organolépticas a la planta como es el caso de los pigmentos característicos de las antocianinas.

Cabe destacar que los metabolitos secundarios son productos naturales, y poseen un alto valor medicinal y económico derivado de su uso cosmético, alimentario y farmacéutico. Una amplia variedad de productos naturales ha sido utilizada ancestralmente como parte del tratamiento de salud primario, por este motivo en la actualidad y gracias a la amplia investigación realizada sobre varios metabolitos, estos productos son empleados como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de

sabor, aromas, colorantes, preservantes, etc. (Avalos García & Pérez-Urria Carril, 2011).

1.6.1. Moléculas esteroideas

Los esteroides constituyen un grupo de metabolitos secundarios con alta importancia biológica, producido por especies vegetales, animales y microorganismos. Están formados típicamente por un esqueleto tetracíclico de carbono denominado 1,2-ciclopentanoperhidrofenantreno (5α - o 5β -gonano), presentando usualmente sustitutos metílicos en C-10 y C-13 y un sustituto álcali (cadena lateral) en C-17 (Figura 2). En especies vegetales, estas moléculas son conocidas como fitosteroles, y existen más de 100 tipos gracias a los varios estados oxidativos de los átomos de carbono presentes en su estructura tetracíclica y a la estructura de su cadena lateral. El interés en estos metabolitos ha aumentado en los últimos años debido a las múltiples funciones que cumplen en diversos organismos, siendo de gran importancia la capacidad hipocolesterolémica y la contribución a disminuir enfermedades cardiovasculares (Gunaherath & Gunatilaka, 2014; Yang *et al.*, 2019).



Los fitosteroles pueden ser clasificados bajo diversos criterios, de esta manera, Dinan, Harmatha y Lafont (2001), mencionan que pueden ser divididas en tres grupos basadas por su relevancia biológica:

- Sustancias que tienen roles fisiológicos en la planta, como hormonas o feromonas, aquí se pueden destacar los brasinoesteroides que son fitohormonas promotoras del crecimiento.
- Sustancias aleloquímicas relacionadas a hormonas animales, como los ecdiesteroides, análogos a hormonas de insectos, y también andrógenos, estrógenos, progestágenos y corticoesteroides relacionados a hormonas de mamíferos.
- Sustancias aleloquímicas específicas a plantas, mismas que frecuentemente brindan acciones de defensa contra fitófagos o animales. Entre estas se destacan las cucurbitacinas, cardenólidos bufadienolides y alcaloides esteroidales.

Por otra parte, Gunaherath & Gunatilaka (2014), mencionan que estas moléculas pueden ser clasificadas en seis grupos basados en consideraciones taxonómicas, su estructura y sus funciones biológicas como se puede observar en la tabla 4.

1.6.1.1. Fitohormonas esteroidales análogas a las hormonas de mamíferos

Estos metabolitos se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes especies vegetales, sin embargo, los niveles detectados son relativamente bajos ($\mu\text{g/kg}$). Las principales fitohormonas análogas a hormonas de mamíferos detectadas en plantas son la progesterona, andrógenos y estrógenos (Waksmundzka-Hajnos, Sherma, & Kowalska, 2008).

1.6.2. Técnicas de detección de moléculas esteroideas

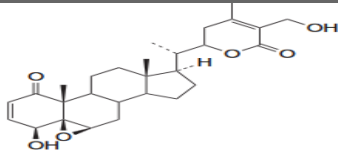
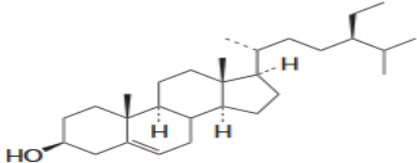
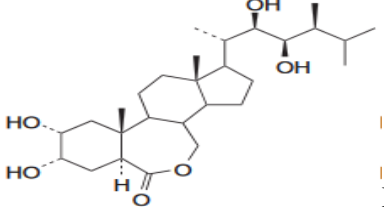
Para la detección de fitoesteroides se usan técnicas colorimétricas la reacción de Liebermann Burchard, que genera una reacción de condensación entre el grupo hidroxilo en posición C-3 del esteroide con el anhídrido acético, generando así, un ester. Si el esteroide posee doble enlace, inicialmente se genera una epimerización y luego una deshidratación a la forma C-3, lo cual provoca un color azul- verde oscuro, indicativo de la presencia específica de 3- hidroxisteroides y otros esteroides que se encuentren en la muestra (Araujo et al., 2013). Esta prueba se utiliza además para la cuantificación de estas moléculas, como lo realizaron Rai, Pai, & Kedilaya (2013), quienes, realizaron una curva de calibración a través de la utilización de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Esta curva de calibración permitió la posterior cuantificación de los esteroides.

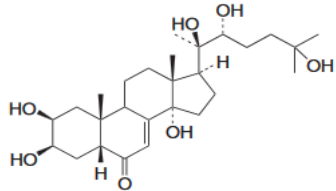
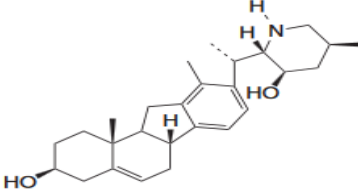
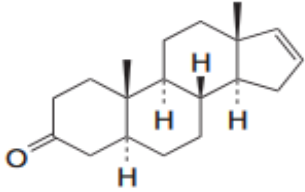
Por otra parte, la técnica de Salkowski también se utiliza para esteroides, mismos que generan la aparición de una interfase de color amarillo, esto debido al anillo esteroideo presente en la muestra. Esta reacción es utilizada netamente para el análisis cualitativo, no solamente de esteroides sino además, de otros principios activos como triterpenos ya que en ambos casos se presenta una estructura base isoprenoide (Rondón *et al.*, 2015).

También se pueden utilizar análisis cuantitativos como estudios cromatográficos, mismos que se emplean de diferente manera para la separación de los diversos tipos de moléculas esteroideas. Entre las metodologías cromatográficas utilizadas se puede destacar la cromatografía de capa fina (TLC), la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) (Dinan *et al.*, 2001; Gunaherath & Gunatilaka, 2014)

Tabla 4.

Grupos de moléculas esteroideas vegetales.

Grupo	Función principal	Ejemplo
Withanólidos	Son lactonas esteroideas cuya función en las plantas no se encuentra completamente comprendida, pero han mostrado actividades significativas en mamíferos.	 <p>Withaferina</p>
Fitoesteroles	Componentes integrales de bicapa lipídica de la membrana celular, misma que controla la permeabilidad de la membrana.	 <p>β-Sistosterol</p>
Brassinoesteroides	Actúan como hormonas de la planta y tienen funciones esenciales en el desarrollo de la misma.	 <p>Brassinólido</p>

Fitoecdisteroides	Son estructuralmente similares a las hormonas de la muda de los insectos.	 <p>10-Hydroxyecdisona</p>
Alcaloides esteroidales	Se conoce que actúan como repelentes de insectos y como barreras ante patógenos.	 <p>Veratramina</p>
Fitohormonas esteroidales análogas a las hormonas de mamíferos	Son análogos a las hormonas esteroidales de mamíferos como estrógenos, andrógenos y progestágenos.	 <p>Androsterona</p>

Elaborado por: La autora, 2019

Fuente: (Gunaherath & Gunatilaka, 2014)

Capítulo 2

Metodología

2.1. Recolección del material vegetal

Se recolectaron 8 kg de material vegetal en la Ruta Ecológica “El Chaquiñán” en Tumbaco, Ecuador en las Coordenadas 0° 10' 37'' S 78° 23' 00'' W (Anexo 1).

Se procedió a la separación del material vegetal en tres grupos: flores, hojas y partes aéreas.

2.2. Obtención de extractos etanólico y clorofórmico

Inicialmente se procedió a secar las partes aéreas de la planta a 35 °C en una estufa ECOCELL 55 Oven, con control de temperatura de 0.1 °C y estabilidad de 0.5 °C, durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se trituró (Anexo 2) el material vegetal y se conservó a 4°C para utilizarlo conforme a la preparación de los extractos.

El proceso extractivo fue ejecutado empleando etanol absoluto ACS BASIC y cloroformo EMSURE® ACS, ISO, grado reactivo como solventes. La técnica utilizada fue la percolación, la cual consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. Para los dos solventes utilizados, se realizó una etapa previa de humectación (Anexo 3), que, como mencionan que debe realizarse fuera del cuerpo del percolador para impedir que el material vegetal se comprima sobre las paredes del percolador y evite que el solvente pase por la droga. Esta fase tiene el fin de aumentar la porosidad de la pared celular, mejorando de esta manera la extracción de las sustancias de interés (Council of Europe, 2013; Jain & Soni, 2012). Conforme a esto se procedió a humectar 100 g de material vegetal con 100 mL de solvente, conformando una masa, que fue dejada en reposo durante dos horas. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a preparar el percolador (Anexo 4) colocando algodón en la base para filtrar cualquier impureza, luego se colocó el material vegetal,

compactándolo, posterior a esto, se vertió 100 mL de solvente, mismos que son retirados, generando un primer menstruo, el cual que se vuelve a colocar en el percolador, finalmente se cubre con papel aluminio el percolador para evitar el contacto del extracto con la luz y a su vez proteger a las moléculas fotosensibles que se encuentren en el mismo.

La percolación fue realizada durante 48 horas a temperatura ambiente hasta la obtención de un extracto etanólico. El etanol fue eliminado utilizando un Rotavapor IKA- Bs1HB10-RV10 a 40 °C para generar un extracto fluido mismo que presenta 1 g de droga en 1 mL de este (Council of Europe, 2013), además se filtró el extracto obtenido para liberarlo de impurezas (Anexo 5).

2.3. Extracción de aceite esencial

Para la obtención del aceite esencial se empleó la técnica de hidrodestilación. Al calentar esta mezcla, las moléculas aromáticas contenidas en la planta se liberan a manera de una mezcla azeotrópica, mezcla líquida que tiene un punto de ebullición constante y cuyo vapor tiene la misma composición que el líquido, además el sistema de condensación permite la separación de la mezcla agua-aceite esencial por decantación, lo cual se da por la diferencia de densidad de las fases. El sistema de hidrodestilación es un método ideal para plantas herbales y aromáticas, es altamente efectivo y permite obtener altos rendimientos (Hashemi *et al.*, 2018), por ende, se utilizó un destilador con trampa Clevenger (Anexo 6). Se colocó 100 g de material vegetal en un balón de destilación de 1000 mL con 500 mL de agua destilada y se procedió a destilar durante tres horas.

Cabe destacar que, en el caso de las flores de la especie, se colocó 30 g de material vegetal debido a la poca disponibilidad de las mismas.

Una vez destilado el material vegetal se procedió a la recolección del aceite esencial, el cual fue envasado en viales ámbar ANSI 48 de 2 mL (Anexo 7). A este se añadió una pizca de sulfato de sodio anhídrido para retirar las trazas de agua presentes (Herrera & Villegas, 2017).

Además, se calculó el porcentaje de rendimiento con la fórmula señalada por Elyemni *et al* (2019):

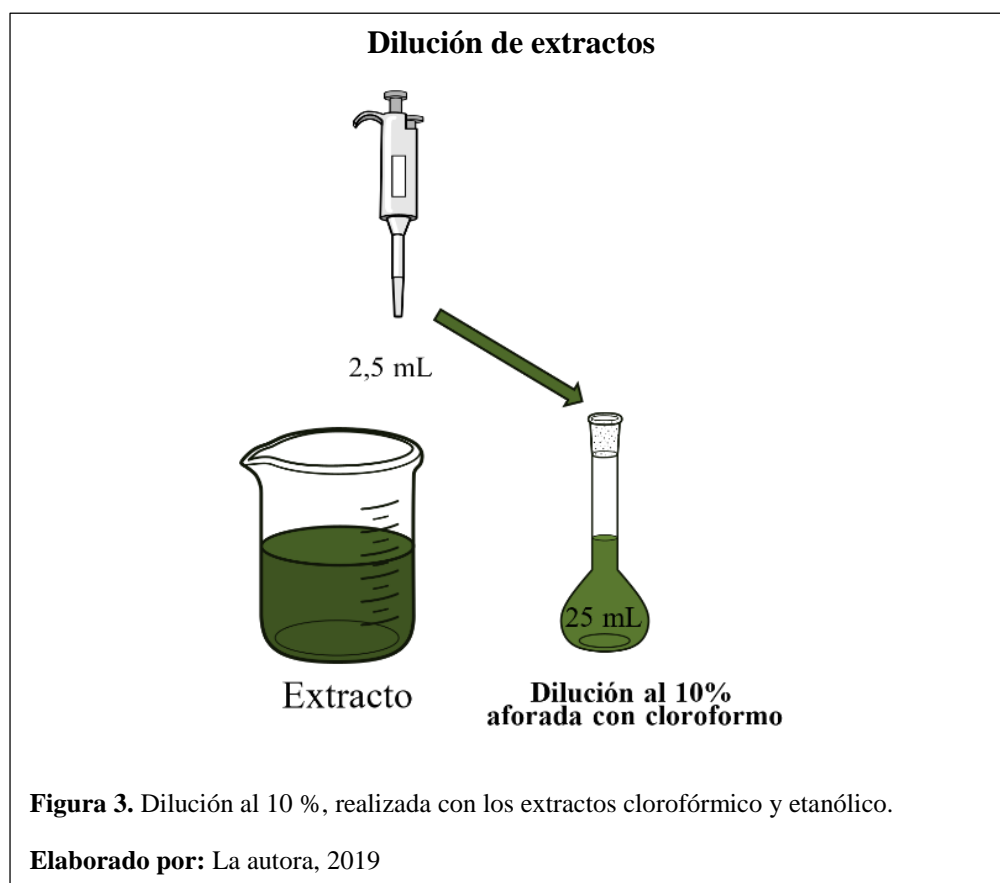
$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Volumen de aceite esencial}}{\text{Gramos de material vegetal}} * 100$$

Este procedimiento fue realizado en cuatro repeticiones en el caso de partes aéreas y hojas, en cuanto a flores se destiló en dos repeticiones debido a su baja disponibilidad. El aceite esencial se conservó a 4 °C (Elyemni *et al.*, 2019).

2.4. Cuantificación de Esteroides Totales

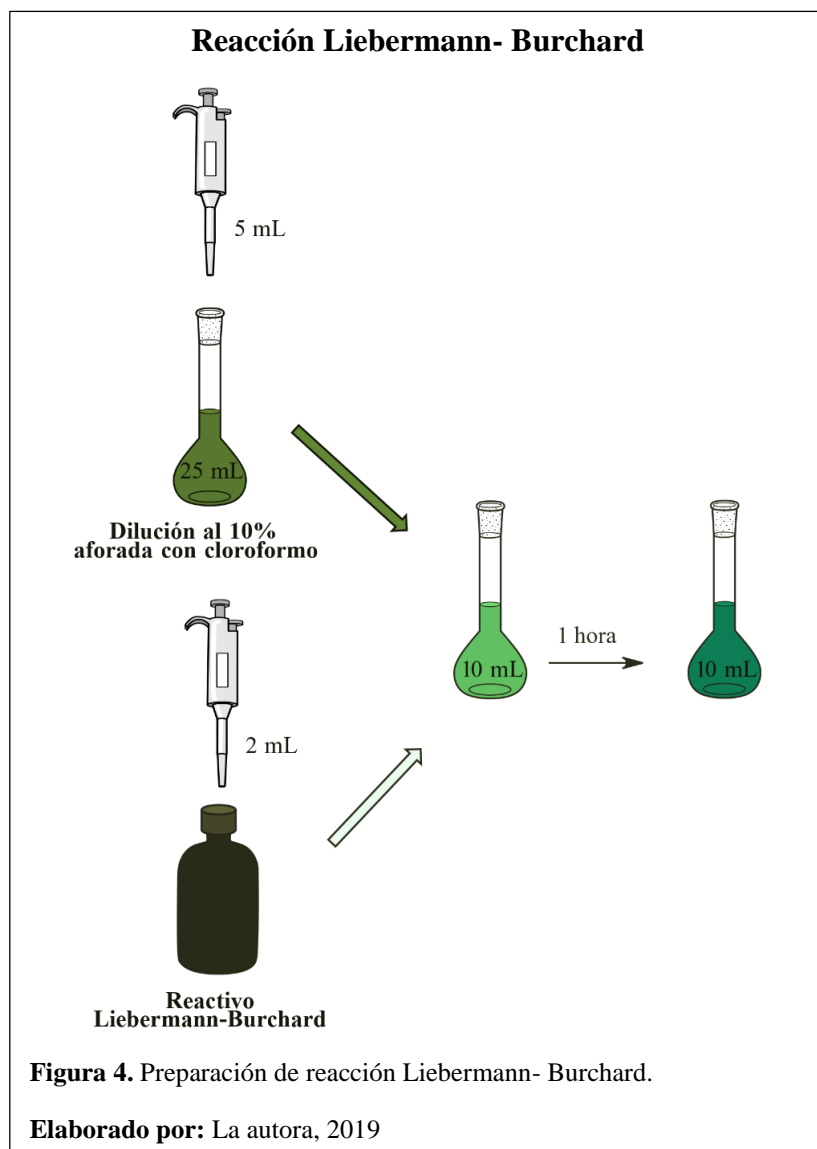
Inicialmente se preparó el reactivo de Liebermann Burchard como lo señalan Kim & Goldberg (1969), se enfrió anhídrido acético ACS Pharmco-aaper y ácido sulfúrico concentrado grado reactivo ACS Pharmco-aaper en baño de hielo, posteriormente se añadió a un frasco ámbar 24.4 mL de anhídrido acético frío y 22.2 mL de ácido acético glacial 100 % EMSURE® ACS, ISO, grado reactivo. Se mezcló por inversión y se añadió 3.3 mL de ácido sulfúrico concentrado frío. El reactivo fue conservado a 4 °C. Para realizar la prueba, se prepararon estándares disolviendo colesterol grado analítico de pureza >99 % en cloroformo hasta lograr concentraciones de 25, 100, 250 y 1000 µg/L (Anexo 8).

Además, se diluyeron los extractos en cloroformo a una concentración de 5 % (Figura 3).



Se aplicó la reacción de Liebermann Burchard por lo que se procedió a generar la reacción como lo señalan Araujo y otros (2013), colocando un mililitro del reactivo en una dilución al 10 %, esto se representa en la Figura 4.

Una vez ejecutada la técnica colorimétrica, se esperó una hora y se procedió a realizar la lectura en un espectrofotómetro UV-VIS (Jasco V-730), se colocaron las muestras en celdas de vidrio y se realizó la lectura de los valores de absorbancia a 625 nm, misma que es ideal para la reacción como mencionan Araujo y otros (2013). Cabe destacar que para la cuantificación de esteroides en los extractos se utilizó como blanco al extracto diluido sin reactivo Liebermann-Burchard, pues como señalan Pires, Torres, dos Santos, & Chow (2017) esto evita la pigmentación clorofílica del extracto altere la lectura de la absorbancia.



2.5. Separación e identificación de estructuras químicas por técnicas cromatográficas

2.5.1. Identificación de los componentes químicos del aceite esencial por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Las estructuras de las moléculas aromáticas del aceite esencial fueron analizadas en un equipo de cromatografía gaseosa acoplada a masas (GC - MS), que cuenta con un cromatógrafo marca Bruker, modelo SCION43 y un espectrómetro de masas marca Bruker, modelo EVOQ-TQ. Las condiciones instrumentales fueron las siguientes: Columna DB5 30m-250um, con Helio como fase móvil. La temperatura se programó

a 55 °C con incremento de 1 °C por minuto hasta alcanzar 100 °C, posteriormente, el incremento fue de 5 °C por minuto hasta llegar a 250 °C, temperatura que fue mantenida por 15 minutos (Scalvenzi *et al.*, 2017). La inyección en modo Split se llevó a cabo disponiendo una dilución de 20 µL del aceite esencial con 980 µL de diclorometano, con una temperatura de inyector de 280 °C, el tiempo total del análisis fue 90 minutos. El espectrómetro de masas contó con un voltaje de ionización -70 eV, temperatura de fuente de 200 °C y temperatura de línea de transferencia de 250 °C. El modo de análisis fue full scan con rango de masas de 40-400 Da. El software empleado en los análisis de identificación de compuestos es MS-Workstation de Burker con integración al NIST-MS-Search. La identificación de los componentes químicos se verificó comparando los Índices de Retención (A_i) experimentales con los teóricos; los A_i experimentales se calcularon usando los tiempos de retención de una serie de alcanos (C8-C30) empleando la siguiente fórmula:

Índice de Retención

$$A_i = \frac{Tra - Trb}{Trc - Trb} * (100 * Z) + (100 * n)$$

Dónde: Tra, es el tiempo de retención promedio de cada compuesto presente en el aceite esencial; Trb, es el tiempo de retención del alcano con el menor número de carbonos; Trc, es el tiempo de retención del alcano con el mayor número de carbonos; Z, es la diferencia entre el número de carbonos del alcano mayor con el carbono menor; n, es el número de carbonos del alcano con menor número de átomos de carbono (P. Noriega, 2009).

La identidad de los compuestos químicos fue confirmada con la comparación en la base de datos EI- MS librería comercial NIST, el cálculo del IK (Índice de Kovats) experimental, en contraste con los IK teóricos encontrados en el texto “Identificación

de componentes de aceites esenciales por cromatografía gaseosa a espectrometría de masas” (Adams, 2017) .

2.5.2 Identificación de los componentes químicos de extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Para verificar la estructura química de las moléculas esteroideas de los extractos, se procedió a separar los componentes mediante cromatografía de capa fina (TLC), como lo señala Guerra (2016). Se trabajó con un aplicador para TLC de marca CAMAG modelo Linomat IV (Anexo 9), el cual se encuentra acoplado a computador con el software winCATS, este se configuró para que se inyecte 40 µL de extracto etanólico de flores y partes aéreas en la fase estacionaria constituida por placas HPTLC de sílica gel 60 F₂₅₄ 20 cm x 20 cm (Anexo 10). El equipo utiliza nitrógeno para la inyección y fijación de las bandas. De esta manera, se diseñaron seis bandas de 10 mm de ancho para cada extracto, con una distancia de 12.8 mm entre cada banda. A continuación, la placa preparada fue eluida en la cámara para TLC con fase móvil constituida por una mezcla de Tolueno/Acetato de etilo/Éter de petróleo 93/7/20 (Anexo 11). Esta fase móvil fue seleccionada, debido a que es considerada como una de las mezclas ideales para la separación de derivados terpénicos como los esteroides (Scalvenzi *et al.*, 2017). Una vez que la fase móvil llegó hasta 1 cm antes del borde, se retiraron las placas y se secaron por 10 minutos para su posterior revelado con Lieberman - Burchard. Al revelar las placas, se procedió a identificar la porción esteroidea, en una cámara reveladora para TLC a una longitud de onda de 254 nm y 365nm. Las fracciones seleccionadas fueron raspadas y diluidas en 1 mL de diclorometano, se filtró con una membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0.45 µm y se colocó en nuevos viales para proceder a realizar la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de

masas bajo los parámetros utilizados para la identificación de la composición química de los aceites esenciales.

2.6. Diseño experimental

Para corroborar la varianza de los resultados cuantitativos (concentración de esteroides totales) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con una prueba post-Hoc de comparación de medias de Tukey, debido a que en el estudio realizado se operan las variables solventes y parte vegetal utilizada como se observa en la Tabla 5. Rodríguez Franco, Pierdant Rodríguez, & Rodríguez (2014), indican que este análisis estadístico es ideal para evaluar datos provenientes de experimentos comparativos, además es útil para estudios en el que dos factores pueden influenciar en los resultados obtenidos de las unidades experimentales. El análisis estadístico fue realizado en el software GraphPad Prism Versión 8.0.2 para Microsoft Windows®.

Tabla 5.

Diseño experimental

Unidad experimental	Evaluación	Unidad de medida
Extracto etanólico de flores	Cuantificación de esteroides	mg esteroides/ g droga
Extracto clorofórmico de flores	Cuantificación de esteroides	mg esteroides/ g droga
Extracto etanólico de partes aéreas	Cuantificación de esteroides	mg esteroides/ g droga
Extracto clorofórmico de partes aéreas	Cuantificación de esteroides	mg esteroides/ g droga

Elaborado por: La autora, 2019.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1 Extracción de aceite esencial

Una vez realizada la hidrodestilación en cuatro repeticiones, se tomó el aceite de cada parte de la planta destilada (Anexo 12), obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 6.

Rendimientos de aceite esencial por estructura vegetal

Estructura vegetal	Materia prima empleada (g)	Cantidad de aceite obtenida (mL)	Rendimiento (%)	Rendimiento promedio (%)	DS
Partes aéreas	100	0.6	0.60	0.625	±0.05
		0.7	0.70		
		0.6	0.60		
		0.6	0.60		
Hojas	100	0.8	0.90	0.775	±0.05
		0.7	0.80		
		0.8	0.80		
		0.8	0.80		
Flores	30	0.2	0.66	0.495	±0.233
		0.1	0.33		

Elaborado por: La autora, 2019.

Como se puede observar en la tabla 6, el aceite esencial de hojas presenta el mejor rendimiento de las partes vegetales utilizadas con un valor de $0.775 \pm 0.05 \%$, sin embargo, este rendimiento es menor en relación a lo reportado por Benzo y otros en 2007, quien al extraer el aceite esencial de *Clinopodium tomentosum* obtuvo un rendimiento de 2.8 % referido a la planta seca.

La diferencia de rendimiento en un aceite esencial se ve dispuesta por un sin número de factores que afectan a la producción de metabolitos secundarios. Tanto la geografía del lugar en donde se recolecta la planta, como las condiciones climáticas y

ambientales del lugar y el estado vegetativo de la planta, son puntos que influyen en la cantidad y calidad del aceite esencial (Giacometti *et al.*, 2018), por este motivo puede existir una variación de rendimientos en la extracción del aceite esencial, comparando este estudio con investigaciones previas de la misma especie.

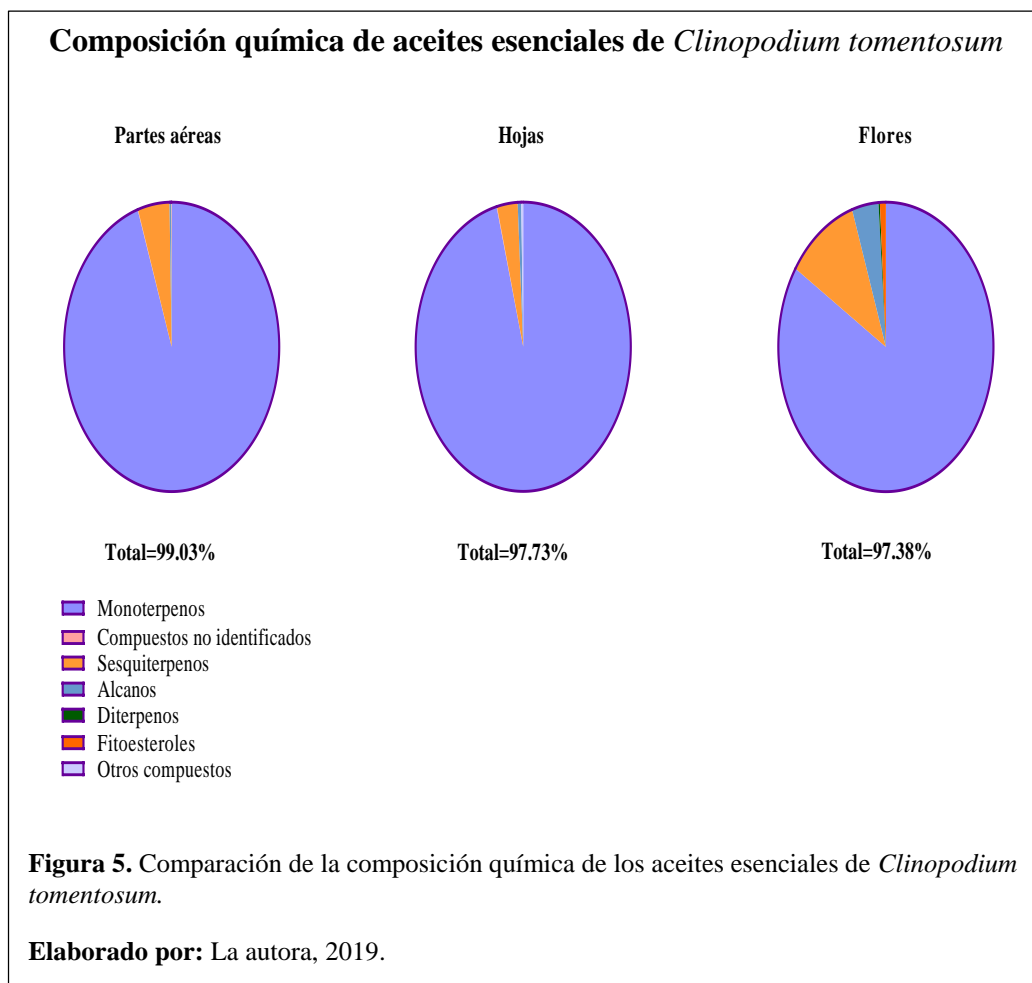
Además, cabe destacar que las técnicas de extracción también influyen en el rendimiento del aceite obtenido. Guan y otros, experimentaron en el 2019 diferentes metodologías de extracción de aceite esencial, siendo la hidrodestilación la técnica con menor porcentaje de rendimiento. En el estudio realizado por Benzo y otros en 2007, la técnica utilizada fue destilación por arrastre de vapor, donde a diferencia de la hidrodestilación, el material vegetal no entra en contacto directo con el agua, siendo el vapor el causante de la ruptura de las glándulas productoras de aceite esencial, lo cual ayudó a obtener mejores rendimientos (Santana de Oliveira *et al.*, 2019).

3.2 Composición química de aceites esenciales

Una vez realizado el análisis mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con los aceites esenciales obtenidos de partes aéreas, hojas y flores de *Clinopodium tomentosum*, se pudo dilucidar su composición química, misma que se ve reflejada en la Tabla 7.

Los cromatogramas del estudio realizado se observan en los Anexos 13, 14 y 15.

En los aceites esenciales se identificaron un total de 99.06 % de compuestos en partes aéreas, 97.67 % en hojas y 97.38 % en flores. En la figura 5, se realiza una comparación de los compuestos identificados en los tres aceites esenciales, los cuales en su mayoría son monoterpenos, correspondientes al 93.95 % en partes aéreas, 93.83 % en hojas y 81.90 % en flores, seguidos de sesquiterpenos cuyos porcentajes son 4.71 % en partes aéreas, 3.03 % en hojas y 10.52 % en flores. El porcentaje restante contiene alcanos, diterpenos, fitoesteroles y otros compuestos.



Los resultados alcanzados coinciden con la investigación realizada por Benzo y otros en 2007, en la que se identificaron monoterpenos como componentes mayoritarios en el aceite esencial de *Clinopodium tomentosum*, además, Romani y otros en 2019, reconocieron la presencia de 96.2 % de monoterpenos oxigenados en el aceite esencial de la misma especie, esto concuerda con los porcentajes obtenidos para los diferentes aceites esenciales de este estudio, presentando un 90.97 % de monoterpenos oxigenados en partes aéreas, 91.26 % en hojas y 81.13 % en flores.

Tabla 7.Composición química de los aceites esenciales de partes aéreas, hojas y flores de *Clinopodium tomentosum* analizados por GC-MS.

Aceites Esenciales de <i>Clinopodium tomentosum</i>.									
No.	Compuesto	AI^a	AI^b	Partes aéreas (%)	D.E.	Hojas (%)	D.E.	Flores (%)	D.E.
1	3-Etil pentano	653	639	-	-	0.02	± 0.00	-	-
2	N.I.	-	702	0.02	± 0.01	-	-	-	-
3	Tetrahidro-2,5-dimetil furano	711	710	-	-	0.04	± 0.01	-	-
4	α-Pineno	939	938	0.23	± 0.03	0.23	± 0.04	-	-
5	Sabineno	975	985	0.11	± 0.02	0.18	± 0.12	-	-
6	β-Pineno	979	991	0.22	± 0.00	0.28	± 0.10	-	-
7	Mirceno	990	1005	0.23	± 0.02	0.19	± 0.07	-	-
8	3-Octanol	991	1011	0.05	± 0.02	-	-	-	-
9	Limoneno	1029	1037	2.19	± 0.15	1.69	± 0.10	0.77	± 0.25
10	Linalol	1096	1110	0.04	± 0.01	-	-	-	-
11	Mentona	1148	1157	0.08	± 0.05	-	-	-	-
12	Isopiperitenona	1190	1263	0.47	± 0.04	-	-	0.86	± 0.22
13	Pulegona	1233	1234	-	-	-	-	0.54	± 0.14
14	Cis-piperitona epóxido	1254	1247	0.21	± 0.07	0.16	± 0.05	.	-
15	Epóxido de trans-piperitona	1256	1254	47.08	± 0.30	41.73	± 0.28	14.73	± 0.51
16	Timol	1290	1295	0.62	± 0.12	-	-	-	-
17	Piperitenona	1340	1340	2.85	± 0.03	-	-	6.73	± 0.14
18	Óxido de piperitenona	1368	1368	39.42	± 0.28	49.37	± 0.48	57.90	± 2.59

19	β -Elemeno	1389	1388	0.28	± 0.01	0.16	± 0.01	0.44	± 0.04
20	3-Ciclopenten-1-ona, 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-	1413	1390	-	-	-	-	0.37	± 0.12
21	N.I.	-	1406	0.03	± 0.00	-	-	-	-
22	E-Cariofileno	1419	1408	1.83	± 0.03	1.31	± 0.04	3.76	± 0.04
23	Cinerolona	1426	1390	0.20	± 0.01	-	-	-	-
24	β -Gurjuneno	1431	1420	0.07	± 0.04	-	-	0.25	± 0.04
25	α -Humuleno	1452	1448	0.04	± 0.01	-	-	0.10	± 0.04
26	Germacrene D	1480	1475	1.62	± 0.01	1.19	± 0.02	3.93	± 0.03
27	Biciclogermacreno	1500	1488	0.24	± 0.00	0.14	± 0.01	0.90	± 0.04
28	δ -Cadineno	1523	1513	0.12	± 0.01	-	-	-	-
29	Z-Nerolidol	1532	1518	0.04	± 0.00	-	-	-	-
30	α -Cedreno	1537	1513	-	-	-	-	0.27	± 0.02
31	Hediciariol	1546	1545	-	-	-	-	0.10	± 0.02
32	2,7-Ciclododecadien-1-ol,1,7-dimetil-4-(1-metiletil)	-	1571	-	-	0.07	± 0.01	-	-
33	Óxido de Cariofilleno	1583	1575	0.08	± 0.01	0.09	± 0.01	-	-
34	τ -Cadinol	1638	1572	0.03	± 0.00	-	-	0.17	± 0.00
35	N.I.	-	1641	0.03	± 0.01	-	-	-	-
36	α -Muurolol	1644	1575	-	-	-	-	0.09	± 0.03
37	α -Cadinol	1652	1652	0.08	± 0.01	-	-	0.16	± 0.01
38	Germacrene D-4-ol	1660	1572	0.10	± 0.00	-	-	-	-
39	Shyobunol	1689	1690	0.18	± 0.01	0.07	± 0.01	0.35	± 0.03
40	n-Nonadecano	1900	1901	-	-	-	-	0.84	± 0.12
41	9-Nonadeceno	1918	1874	-	-	0.23	± 0.02	-	-

42	Óxido de manool	1987	1995	0.02	± 0.00	-	-	0.20	± 0.01
43	n-Docosano	2200	-	-	-	-	-	0.08	± 0.00
44	Acetato de dehidroepiandrosterona	2279	-	0.05	± 0.00	-	-	0.87	± 0.09
45	Tricosano	2300	-	0.17	± 0.03	0.16	± 0.06	2.03	± 0.30
46	Tetracosano	2400	-	-	-	0.10	± 0.03	-	-
47	Hexacosano	2600	-	-	-	0.21	± 0.04	0.94	± 0.07
48	Octacosano	2800	-	0.03	± 0.00	0.05	± 0.00	-	-
Total Compuestos				99.06		97.67		97.38	
Compuestos no identificados				0.08		0.00		0.00	
Monoterpenos hidrocarbonados				2.98		2.57		0.77	
Monoterpenos oxigenados				90.97		91.26		81.13	
Total Monoterpenos				93.95		93.83		81.90	
Sesquiterpenos hidrocarbonados				4.20		2.80		9.65	
Sesquiterpenos oxigenados				0.51		0.23		0.87	
Total Sesquiterpenos				4.71		3.03		10.52	
Diterpenos				0.02		0.00		0.20	
Fitoesteroles				0.05		0.00		0.87	
Alcanos				0.20		0.52		3.89	
Otros compuestos				0.05		0.29		0.00	

N.I.: No identificado, **AI^a:** Índice de retención teórico en columna apolar (Adams, 2017), **AI^b:** Índice de retención experimental calculado en comparación con tiempos de retención de una serie de alcanos C₈-C₂₀, **D.E.:** Desviación estándar; Todas los (%) de áreas tienen una desviación estándar < 5.0 %.

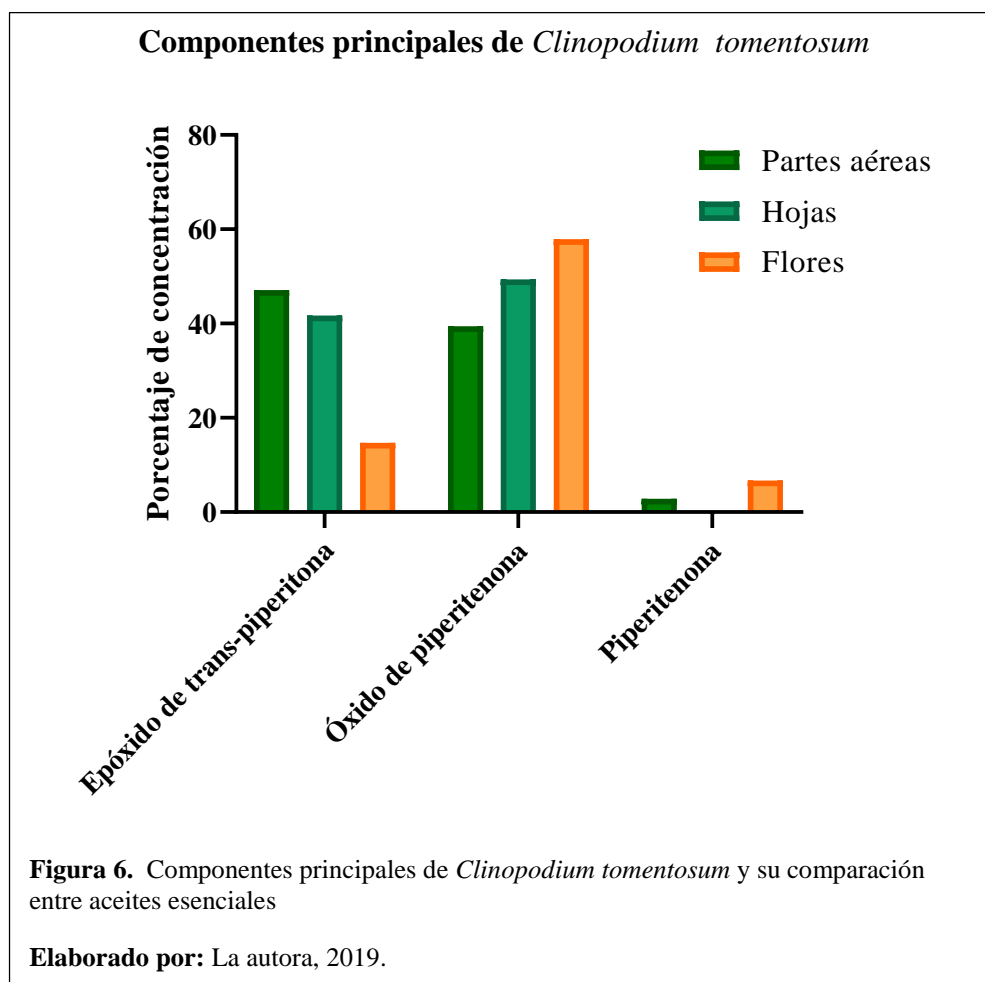
Elaborado por: La autora, 2019.

Existen otras especies nativas ecuatorianas del mismo género que muestran alto contenido de monoterpenos oxigenados, como *Clinopodium taxifolium*, especie ubicada en las provincias del Oro, Azuay y Loja, que contiene un 56.74 % de estos componentes en el aceite esencial. Por otra parte *Clinopodium nubigenum*, especie encontrada en las provincias de Pichincha, Carchi, Tungurahua, Cañar, Azuay, El Oro y Loja presenta un 83.3 % de monoterpenos oxigenados (Morochó et al., 2018; Noriega, Mosquera, Osorio, Guerra, & Fonseca, 2018).

Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales son diferentes según la parte vegetal empleada para la obtención del aceite, así, el epóxido de trans-piperitona es el componente mayoritario del aceite esencial de partes aéreas con un 47.08 %, seguido de óxido de piperitenona con 39.42 % y piperitenona con 2.85 %. En hojas el compuesto mayoritario es el óxido de piperitenona con 49.37 %, seguido de epóxido de trans-piperitona con 41.73 % y limoneno con 1.69 %. En flores estos resultados coinciden, el compuesto mayoritario es el óxido de piperitenona con 57.90 %, seguido de epóxido de trans-piperitona con 14.73 % y finalmente piperitenona con 6.73 % (Figura 6.). Esta variación se ve dada por la diferente estructura vegetal que presentan las partes empleadas, como indica Pergentino de Sousa (2015), los aceites esenciales se pueden producir y almacenar en glándulas secretoras, que, según la parte vegetal en la que se encuentren difieren en morfología, estructura, función y distribución, lo cual influye a su vez en la composición y en el rendimiento del aceite esencial.

Estudios previos indicaron diferentes compuestos mayoritarios para el aceite esencial de *Clinopodium. tomentosum*, en el caso del estudio realizado por Benzo y otros en 2007, se reconoce a la Isomentona como componente mayoritario con un 41.72 %, seguido de la pulegona con 29.94 %, resultados que coinciden con la investigación de Romani y otros (2019), donde se determina que el componente mayoritario del aceite

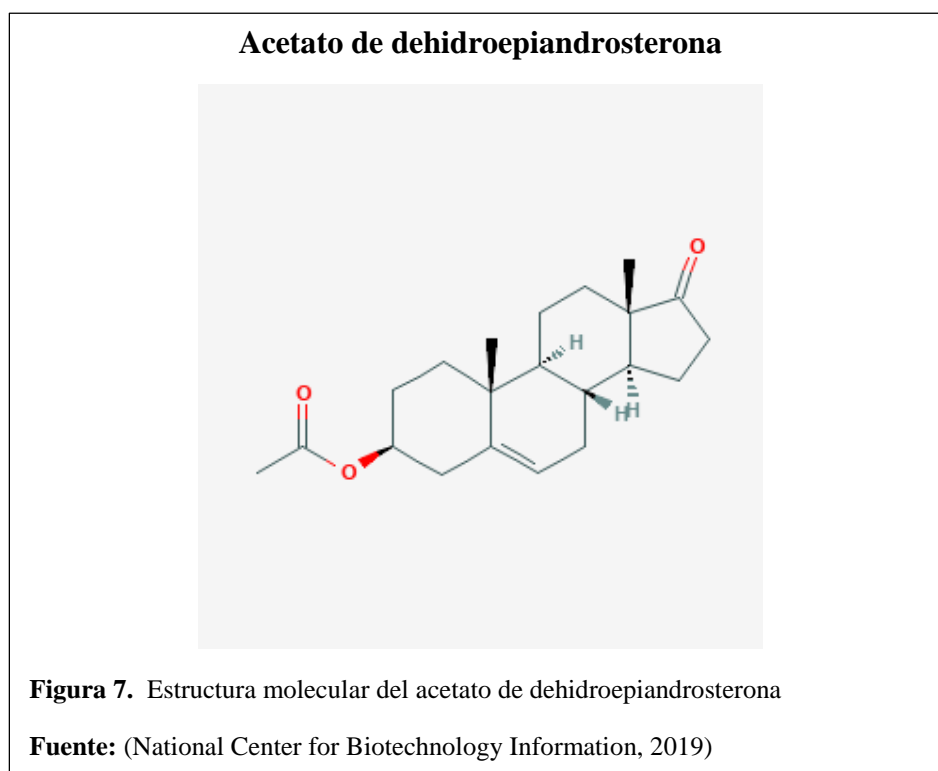
esencial de la especie es isomentona con 48.4 %, siendo el segundo componente la pulegona con 34.3 %. Pese a la significativa variación de los resultados de este estudio con los obtenidos previamente, la caracterización química es similar en grupos químicos, por lo que el perfil de los aceites esenciales es equivalente.



De todas maneras, cabe destacar que los aceites esenciales tienen una alta variabilidad en su composición tanto en términos cualitativos como cuantitativos, esto debido a varios elementos como la metodología de extracción, la interacción de la planta con condiciones ambientales y geográficas como el suelo y el clima, la madurez de la planta e incluso las circunstancias ambientales de la recolección (Dhifi, Bellili, Jazi, Bahloul, & Mnif, 2016). Se debe mencionar que, la especie estudiada ha sido recolectada en diferentes provincias del país en todas las investigaciones, por ende, existen variaciones en las condiciones climáticas, geográficas y de la fisiología de la

planta entre los estudios, lo cual se puede evidenciar en diferencias en su composición química.

Es importante mencionar que en la presente investigación se pudo determinar la presencia del fitoesterol Acetato de dehidroepiandrosterona (Anexo 16), misma que corresponde al grupo de las fitohormonas esteroidales análogas a las hormonas de mamíferos (Figura 7.).

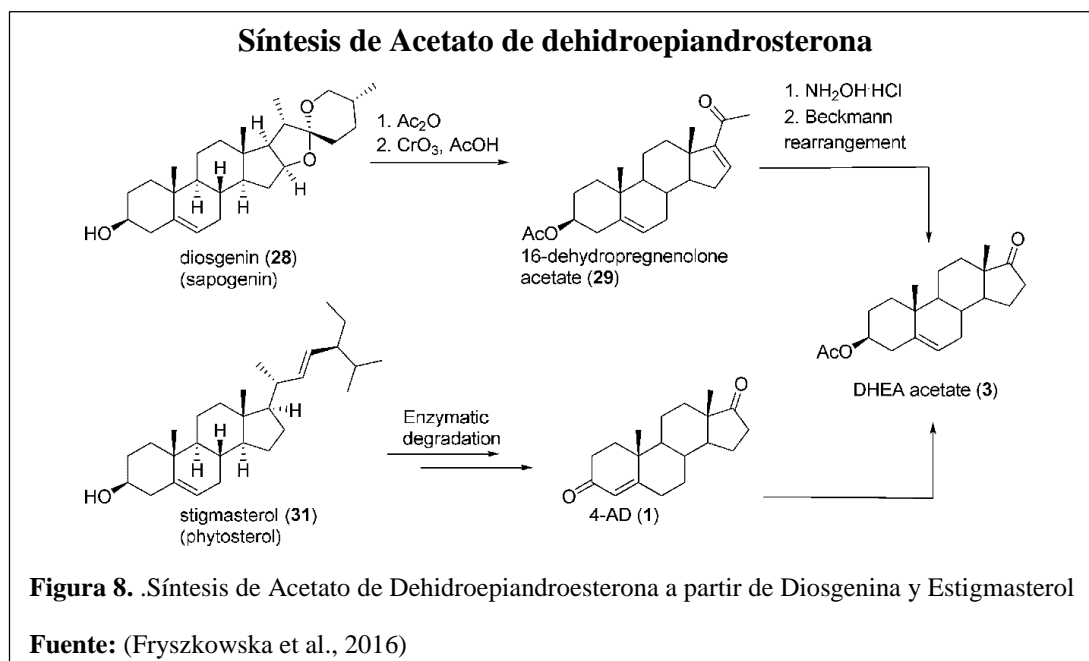


Janeczko y Skoczowski realizaron en 2005 un aproximamiento conceptual acerca de la presencia de hormonas sexuales análogas de mamíferos en plantas. De acuerdo a Dean y otros autores en 2017 señalaron que los fitoesteroides son una clase especializada de metabolitos derivados de plantas que enlazan receptores esteroideos en animales y pueden desencadenar o reprimir señales mediadas por receptor, y específicamente los esteroides relacionados a la biosíntesis de andrógenos regulan una variedad de funciones biológicas incluyendo respuestas reproductivas y adaptativas. Esto concuerda con lo afirmado por Dumlupinar y otros en 2011 en donde aseveran

que las plantas y animales tienen cientos de variantes de compuestos esteroideos, incluyendo a la androsterona, estradiol, y progesterona los cuales fueron de hecho primeramente detectados en plantas. Un ejemplo claro de la presencia de estas moléculas se puede evidenciar en un trabajo realizado recientemente por Waman y otros autores, en 2018, en el cual se encontraron derivados de androesteroides como: 2 β ,3 β -epoxi-2-metil-5 α -androstan-17 β -ol; 3-hidroxiandrostan-17-ona; (3 β ,5 α ,11 β)-androstan-3,11-diol; androstan-3,16-diol; androsterona y 12-hidroxi-(12 β)-androsta-4-eno-3,17-diona en el aceite esencial de rizoma de *Curcuma mangga* alcanzando un total de 2.18 % del total de su composición. En el caso del presente trabajo en el aceite esencial de partes aéreas y flores de *Clinopodium tomentosum* se encontró el acetato de dehidroepiandrosterona un derivado de la androsterona en un 0.05 % y 0.85 % respectivamente para cada parte vegetal. Estos resultados son interesantes ya que, existen estudios previos de análisis del aceite esencial de *Clinopodium tomentosum* realizados en el país, pero no se encontró la presencia de este fitoesteroide. Es importante mencionar que la hormona fue detectada previamente por Zhang y otros (2019) en el aceite esencial de *Solidago caesia*, una planta de la familia Asteraceae, lo que evidencia que la hormona puede distribuirse ampliamente en el reino vegetal. El porcentaje hallado fue de 1.09 % y fue la única especie estudiada que contenía este metabolito.

Este hallazgo permite corroborar el hecho de que la producción de metabolitos secundarios es afectada directamente por las condiciones genéticas, climáticas, geográficas o de estrés que la especie experimente. El metabolito hallado según un estudio propuesto por Fryszkowska y otros autores en 2016, se genera a partir de estructuras precursoras en la planta a partir de reacciones enzimáticas, en la Figura 8

se puede apreciar que el estigmasterol actúa en la biosíntesis del acetato de dehidroepiandrosterona.

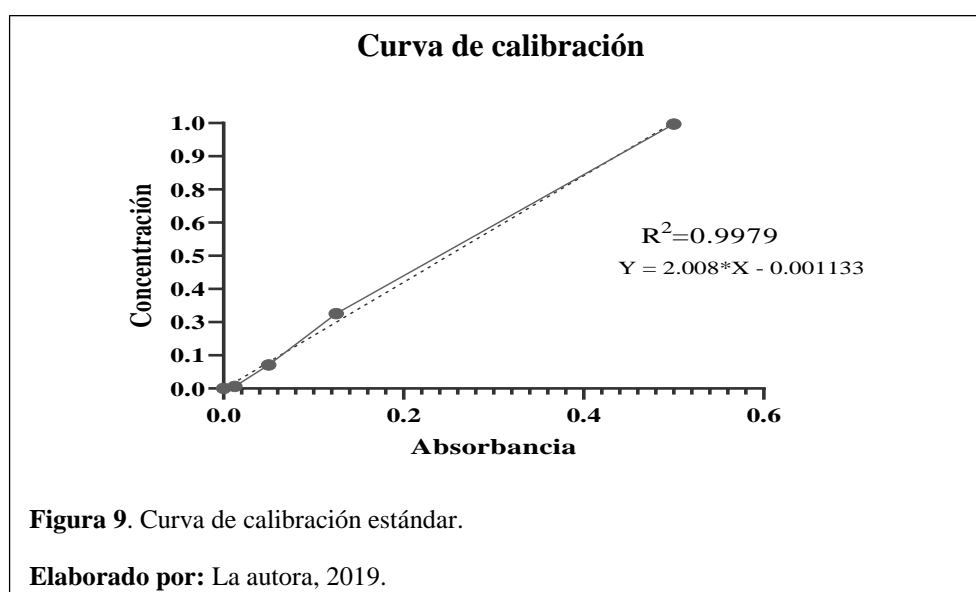


El acetato de dehidroepiandrosterona, es un intermediario farmacéutico importante, como lo mencionan, Cheng y otros autores en 2016, este esteroide ha alcanzado un alto interés industrial debido a su uso para la síntesis de varias hormonas sexuales como la testosterona, metil testosterona, estradiol, estriol y estrógeno. Para llevar a cabo su producción a escala industrial, según Fryszkowska y otros en 2016, los esteroides son a menudo manufacturados mediante procesos alternativos conducidos por la disponibilidad de materias primas de diferente origen, por lo que propusieron una nueva ruta para la síntesis de acetato de dehidroepiandrosterona a partir de 4-androstene-3,17-diona (4-AD) el cual es derivado a su vez de fitoesteroides obtenidos de granos de soya. Este proceso de síntesis conlleva una serie de reacciones enzimáticas y/o químicas en las que se producen algunos intermediarios, pero implican costo, tiempo y condiciones para estabilizar el proceso; en el caso de *Clinopodium tomentosum* en este estudio el esteroide análogo fue hallado de manera natural.

Cabe destacar que el acetato de dehidroepiandrosterona es considerado un precursor de hormonas sexuales femeninas y masculinas, como el estrógeno y la testosterona, por lo cual esta hormona podría influenciar en la generación de hormonas esteroideas producidas por las glándulas maternas endocrinas, estas se encargan de la protección del feto y de cumplir con el desarrollo adecuado de los sistemas vitales en el mismo, motivo por el cual estas hormonas son factores imprescindibles para lograr un embarazo exitoso (Pepe & Albrecht, 2009).

3.3. Cuantificación de Esteroides Totales

Con los estándares preparados, se procedió a calcular la concentración real de la dilución realizada, con este fin, se generó la curva de calibración a partir de las absorbancias (Figura 9), además se obtuvo la ecuación que permitió el cálculo de las concentraciones de esteroides totales en los extractos clorofórmico y etanólico de flores y partes aéreas. Con el R^2 (0.9979) se determinó que el ajuste de los datos a la recta es aceptable, puesto que como menciona Harris (2007), el ajuste es altamente aceptable mientras más se acerque este valor a uno.



En la tabla 8, se evidencia las absorbancias y concentraciones obtenidas a partir de la curva de calibración, en los extractos realizados.

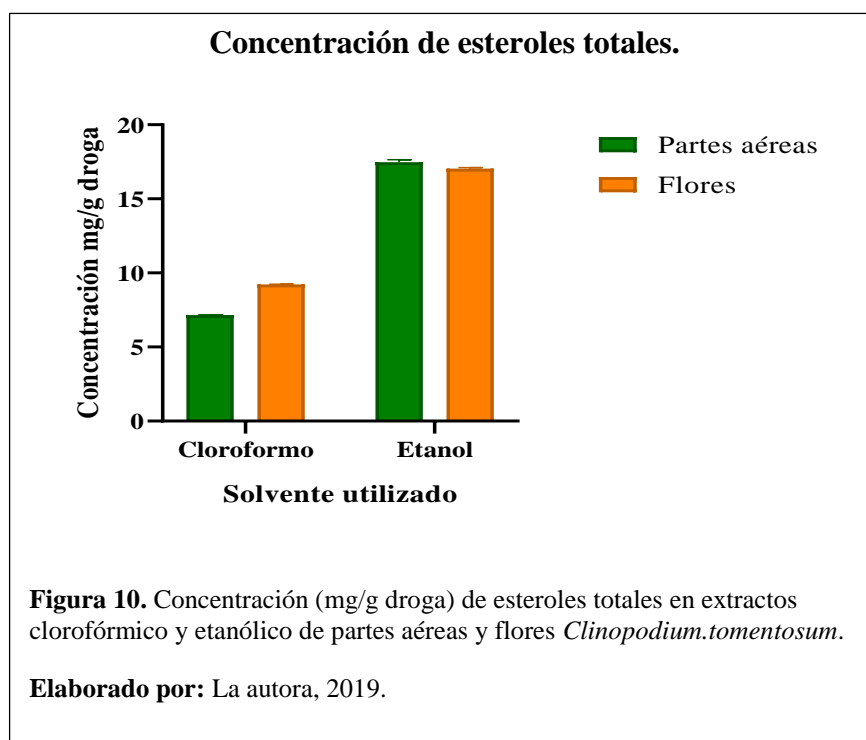
Tabla 8.

Concentración de esteroides totales en extractos.

Estructura vegetal	Extracto	Absorbancia	Concentración (mg/g droga)	Concentración promedio	DS
Flores	Clorofórmico	0.19	9.24	9.23	±0.01
		0.19	9.24		
		0.19	9.23		
	Etanólico	0.34	16.99	17.04	±0.06
		0.34	17.04		
		0.34	17.10		
Partes aéreas	Clorofórmico	0.14	7.18	7.15	±0.02
		0.14	7.14		
		0.14	7.15		
	Etanólico	0.35	17.31	17.49	±0.17
		0.35	17.48		
		0.35	17.65		

Elaborado por: La autora, 2019

Calculadas las concentraciones se pudo determinar que tanto en flores como en partes aéreas el extracto etanólico es aquel que presentó mayor cantidad de esteroides, esto se ve reflejado en la Figura 10.



Una vez realizado el análisis de varianza de dos vías (ANOVA), se obtuvieron los resultados que se reflejan en la Tabla 9.

Tabla 9.

Resultados de análisis de varianza de dos vías

Variable	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	Valor P	Significancia
Parte vegetal	1	2.030	2.030	<0.0001	****
Solvente	1	246.6	246.6	<0.0001	****
Interacción	1	4.741	4.741	<0.0001	****
Error	8	0.06660	0.008325		
Total	11	235.5			

****: Altamente significativo, **: Significativo, Valor α : 0.05

Elaborado por: La autora, 2019.

Como se observa en la Tabla 9 las variables parte vegetal y solvente tienen alta significancia con un valor $P < 0.0001$ con un $\alpha = 0.05$, esto implica que influyen directamente en la concentración de esteroides totales presentes en los extractos preparados, además, la interacción de ambas variables también es altamente significativa. Por otra parte, se debe destacar que el porcentaje de variación de valores según el solvente utilizado es de un 97.30 %, por lo cual podría ser considerada la variable más influyente en la obtención de un mayor o menor valor de esteroides totales, el porcentaje de variación entre partes vegetales es de 0.8 %, lo cual demuestra que el solvente será el factor que varía la concentración de esteroides totales, en este caso el solvente que mejores resultados obtuvo fue el etanol.

En la Tabla 10 se puede observar la comparación múltiple entre las variables partes aéreas y solventes y sus interacciones. Esta comparación fue realizada a partir de los datos obtenidos del ANOVA con una prueba post-Hoc Tukey.

Tabla 10.

Prueba de Tukey

Comparación múltiple de variables	Valor P	Significancia
Extracto clorofórmico de partes aéreas VS extracto clorofórmico de flores	<0.0001	****
Extracto clorofórmico de partes aéreas VS extracto etanólico de partes aéreas	<0.0001	****
Extracto clorofórmico de partes aéreas VS extracto etanólico de flores	<0.0001	****
Extracto clorofórmico de flores VS extracto etanólico de partes aéreas	<0.0001	****
Extracto clorofórmico de flores VS extracto etanólico de flores	<0.0001	****
Extracto etanólico de partes aéreas VS extracto etanólico de flores	0.0017	**

****: Altamente significativo, **: Significativo, **Valor α :** 0.05

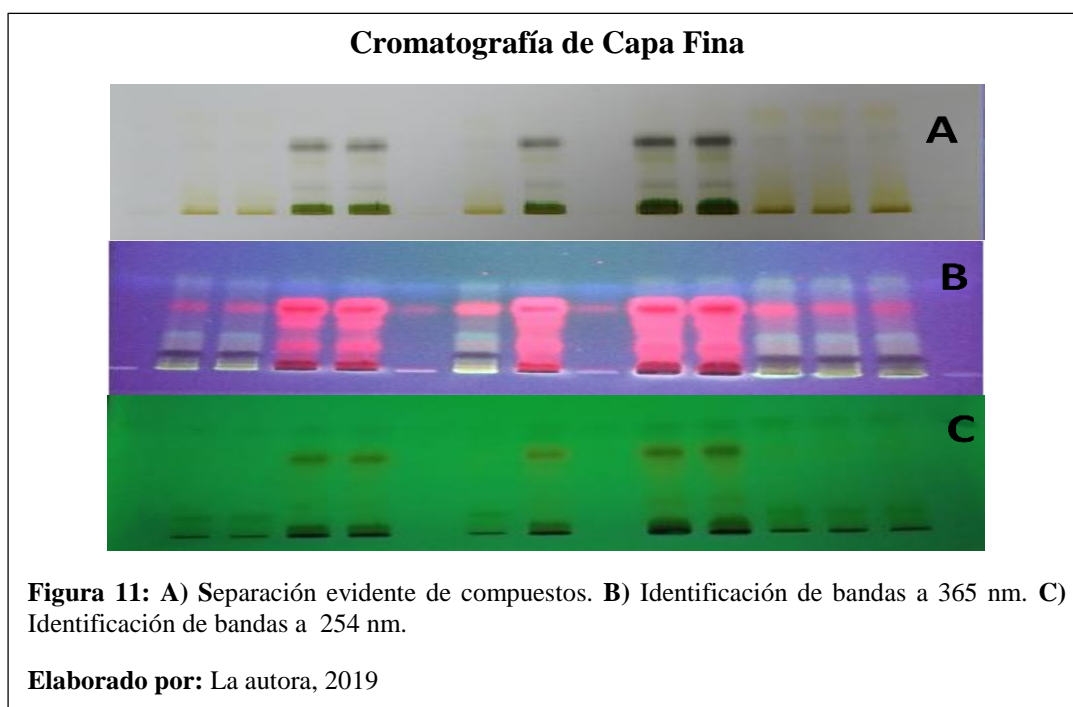
Elaborado por: La autora, 2019.

La Tabla 10 muestra los valores de significancia entre las comparaciones realizadas, de esta manera, la comparación realizada entre el extracto etanólico de partes aéreas y el extracto etanólico de flores, indica significancia, mientras que las demás comparaciones son altamente significativas teniendo en cuenta un 95 % de confianza. Esto se debe a la similitud de los valores encontrados en los extractos etanólicos de ambas partes vegetales, sin embargo, las dos variables influyen en la cuantificación de esteroides totales.

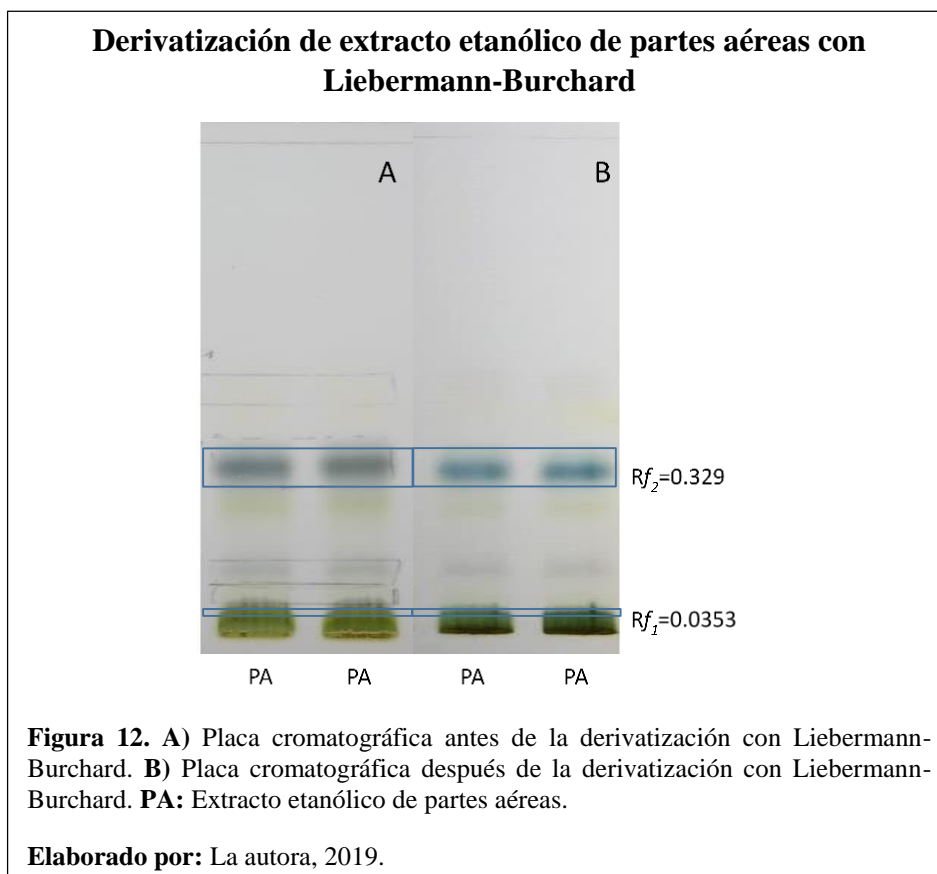
Los resultados obtenidos contrastan con la investigación realizada por Rai, Pai, Kedilaya, & Hegde en 2013, donde la cuantificación de esteroides totales evidenció gran presencia de estos metabolitos en extractos metanólico, etanólico y clorofórmico de hojas de cuatro especies vegetales de la familia Lamiaceae. En la investigación, el extracto clorofórmico se destacó por su afinidad con los esteroides, ya que los extractos preparados con este solvente muestran el porcentaje más alto, por ejemplo, en la especie *Pogostemon patchouli* en el extracto metanólico se cuantificó un 24.00 % de

esteroles, en el extracto etanólico un 49.9 % y en el extracto clorofórmico un 73.40 %. Por otra parte Araújo y otros (2013), detectaron bajos porcentajes de esteroles totales en el extracto hidro-alcohólico de *Acanthospermum hispidum*, el porcentaje cuantificado fue 0.123 %. La variación en porcentajes se puede deber a la afinidad de las moléculas con los distintos solventes, Jyoti Saurov y otros (2019), mencionan que los estudios fitoquímicos en extractos de especies vegetales han mostrado diversa reactividad debido a las variaciones en la polaridad del solvente, con lo cual se obtienen resultados diferentes que establecen concentraciones variables de metabolitos. Efthymiopoulos y otros en 2018, determinaron que la extracción de lípidos cuantificables aumentaba a medida de que se incrementa la polaridad del solvente, en este estudio el solvente que obtuvo mayor cantidad de esteroles cuantificables fue el etanol. Shriner en 2013, menciona que el etanol es más polar que el cloroformo (Anexo 17), lo que permite confirmar que los resultados obtenidos concuerdan con esta información.

3.4. Identificación de los componentes químicos de extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.



Al realizar la TLC de extractos etanólico de partes aéreas y flores se pudo evidenciar la presencia de bandas como se observa en la Figura 11 A. Además, la identificación de todas las bandas se realizó al colocar las placas en la cámara reveladora para TLC a diferentes longitudes como se observa en las Figuras 11 B y C. Al aplicar la prueba Liebermann-Burchard se pudo observar el cambio de coloración en dos bandas del extracto etanólico de partes aéreas como se muestra en la figura 12. Las bandas se tornan de color azul, lo cual indica la presencia de esteroides como lo señalan Alfa, Ayodeji, Anthony, Teru, y Tijani (2019).



En el caso del extracto etanólico de flores, no se evidenció ningún cambio de coloración (Anexo 18), lo cual puede deberse a la poca afinidad de los compuestos con la fase móvil ya que como mencionan Komsta, Waksmundzka-Hajnos, y Sherma (2014), la separación de compuestos en la cromatografía de capa fina dependerán del uso de fases móviles ideales para la elución de los metabolitos de interés.

Al inyectarse las fracciones obtenidas en el GC/MS no se obtuvieron resultados que evidencien la presencia de esteroides en los extractos, sin embargo, se detectaron compuestos no identificados que no se encuentran registrados en las librerías del espectrómetro de masas.

A pesar de que globalmente existen procedimientos de detección y cuantificación estandarizados para diferentes metabolitos, en el caso de los fitoesteroles análogos a hormonas de mamíferos el panorama es confuso y complicado, ya que varias investigaciones no han logrado la identificación molecular de compuestos de este tipo, esto se debe principalmente a las mínimas concentraciones que presentan las especies vegetales en comparación a otros tipos de esteroides (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008).

No se pudo detectar el acetato de dehidroepiandrosterona en extractos pese a que fue identificado en aceites esenciales, esto puede deberse a varias razones, entre ellas la lipofilicidad de estas moléculas. Como mencionan Bhawani, Sulaiman, Hashim, y Mohamad (2010), en estos compuestos la lipofilicidad es una propiedad inherente que influye tanto en su actividad biológica como en el transporte de compuestos a través de sistemas biológicos. Esta propiedad puede afectar la afinidad de las hormonas con la fase estacionaria, por lo que se debe utilizar una placa cromatográfica RP-18 HPTLC. Por otra parte, Cheng y otros (2016) indican que la solubilidad de esta hormona varía según el solvente utilizado, considerando al etanol como uno de los solventes menos compatibles con el compuesto, este factor influye directamente en la no detección de la hormona en el extracto etanólico de partes aéreas. Los solventes utilizados en el presente estudio fueron seleccionados en base a estudios previos en los que se cuantificaban esteroides totales en especies vegetales, siendo el cloroformo y el etanol los seleccionados por los investigadores por su (V. Rai et al., 2013)

Conclusiones

En *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts, queda evidenciada la existencia de fitoesteroles como lo demuestran los ensayos espectrofotométricos. Tanto en flores como en partes aéreas la mayor concentración de estos compuestos está contenidas en los extractos etanólicos, lo que podría estar relacionado a que las moléculas esteroideas son pequeñas y por lo tanto mucho más afines a un solvente polar. En el caso particular de esta investigación los esteroides no tendrían pesos moleculares elevados (C₂₀-C₂₁) y esto estaría claramente definido en que en los extractos etanólicos la concentración de esteroides es el doble que en los clorofórmicos.

En los aceites esenciales se evidencia que una concentración mayor de fitoesteroides se determinó en el aceite esencial de las flores, precisamente es esta parte de la planta la que se emplea en los usos tradicionales y de alguna forma centra el interés de investigación en este aceite esencial, en donde, la concentración se acerca al 1 %. En el resto de aceites esenciales (partes aéreas y hojas) se podría decir que los fitoesteroides no son las moléculas de interés.

La espectrometría de masas reveló una posible identidad de la molécula presente en el aceite esencial de las flores como un derivado del androstano de veinte y un átomos de carbono. Debido a que la base de datos con la que cuenta la Universidad no pudo certificar de forma absoluta la molécula en investigación, se determinó como un posible componente de forma general. Dentro del grupo de investigación y desarrollo en ciencias aplicadas a los recursos biológicos (GIDCARB) se tiene previsto investigar a la molécula empleando técnicas espectrométricas de masas de mayor resolución (Orbitab-Trap) para llegar a una verdadera dilucidación molecular a partir de un peso molecular exacto.

Recomendación

Profundizar los estudios con pruebas pre-clínicas para de esta manera tener argumentos completos y recomendar el uso de la planta por sus características hormonales, dado el saber ancestral y los resultados preliminares en donde queda verificada la presencia de fitoesteroles.

Referencias

- Adams, R. P. (2017). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy. In *American Society for Mass* (Vol. 008). <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.07.008>
- Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Abu-Zaitoun, S. Y., Akkawi, R. J., Kalbouneh, S. R., Bernstein, N., & Dudai, N. (2018). Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Clinopodium serpyllifolium* (M.Bieb.) Kuntze growing in Palestine. *Industrial Crops and Products*, 124(August), 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.038>
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Tobar, V., Witte, P. De, & Leuven, U. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1), 89–97. Retrieved from <http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/40/12%5Cnfile://C:/Users/Sony-PC/Desktop/Cursos 2013/Curso escritura articulo/Revision bibliografica/Para el art/Estudio preliminar de plantas medicinales utilizadas Azuay, Ca?a y Loja.pdf%5C>
- Araújo, L. B. D. C., Silva, S. L., Galvão, M. A. M., Ferreira, M. R. A., Araújo, E. L., Randau, K. P., & Soares, L. A. L. (2013). Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(5), 736–742. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500004>
- Arraiza, M. (2010). *Uso industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales*. Universidad

Politécnica de Madrid.

Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., ...

Lyon, C. B. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation.

International Journal of Pharmaceutics, 483, 220–243.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>

Ashokkumar, K., Murugan, M., Dhanya, M. K., & Warkentin, T. D. (2020). Botany,

traditional uses, phytochemistry and biological activities of cardamom [*Elettaria cardamomum* (L .) Maton] – A critical review. *Journal of Ethnopharmacology*,

246(September 2019), 112244. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112244>

Attah Alfa, A., Ayodeji, O. A., Donatus Teru, G. A., & Bajeh Tijani, K. (2019). Studies

on the Phytochemical Compounds in the Ethanolic Leaf Extract (ELE), Ethanolic

Bark Extract (EBE) and Ethanolic Root Extract (ERE) of *Bridelia ferruginea*

Benth (Euphorbiaceae). *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular*

Biology, 2(4), 1–8. <https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2019/v2i430070>

Avalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2011). Metabolismo secundario de

plantas. *REDUCA (Biología)*, 2(3), 119–145. Retrieved from

<http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>

Bedini, S., Flamini, G., Cosci, F., Ascrizzi, R., Echeverria, M. C., Gomez, E. V., ...

Conti, B. (2019). Toxicity and oviposition deterrence of essential oils of

Clinopodium nubigenum and *Lavandula angustifolia* against the myiasis-

inducing blowfly *Lucilia sericata*. *PLoS ONE*, 14(2), 1–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212576>

Bekut, M., Brkić, S., Kladar, N., Dragović, G., Gavarić, N., & Božin, B. (2018).

Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy.

Pharmacological Research, 133, 301–314.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.016>

Benzo, M., Gilardoni, G., Gandini, C., Caccialanza, G., Finzi, P. V., Vidari, G., ...

Layedra, P. (2007). Determination of the threshold odor concentration of main odorants in essential oils using gas chromatography-olfactometry incremental dilution technique. *Journal of Chromatography A*, 1150(1–2), 131–135.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.031>

Bhawani, S. A., Sulaiman, O., Hashim, R., & Mohamad, M. N. (2010). Thin-Layer Chromatographic Analysis of Steroids: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9(3), 301–313.

Bravo-Velásquez, E. (2014). La biodiversidad en el Ecuador. In *Igarss 2014*, Universidad Politécnica Salesiana. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Brodkiewicz, I. Y., Molina, R. D. I., Lopez, G. V., Alberto, M. R., Vera, N. R., & Arena, M. E. (2018). Anti-Pathogenic Activity of Herbs Used in Argentinean Traditional Infusion. *Global Journal of Agricultural Innovation, Research & Development*. ISSN: 2409-9813 - e-ISSN: 2409-9813, 36–46. Retrieved from <http://www.avantipublishers.com/downloads/gjairdv4a5/>

Calvo-Irabien, L. M. (2018). Native Mexican aromatic flora and essential oils: Current research status, gaps in knowledge and agro-industrial potential. *Industrial Crops and Products*, 111(July 2017), 807–822.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.044>

Castillo García, E., & Martínez Solís, I. (2007). *Manual de fitoterapia*. Masson.

Chen, X. B., Liu, X. C., Zhou, L., & Liu, Z. L. (2013). Essential oil composition and larvicidal activity of *Clinopodium gracile* (Benth) Matsum (Labiatae) aerial parts against the *Aedes albopictus* mosquito. *Tropical Journal of Pharmaceutical*

Research. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i5.21>

- Cheng, C., Cong, Y., Du, C., Wang, J., Yao, G., & Zhao, H. (2016). Solubility determination and thermodynamic models for dehydroepiandrosterone acetate in mixed solvents of (ethyl acetate + methanol), (ethyl acetate + ethanol) and (ethyl acetate + isopropanol). *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 101, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.06.014>
- Cheng, C., Cong, Y., Meng, L., Wang, J., Yao, G. B., & Zhao, H. (2016). Solubility measurement and thermodynamic functions of dehydroepiandrosterone acetate in different solvents at evaluated temperatures. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 97, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.01.023>
- Chetta, A., & Olivieri, D. (2012). Role of inhaled steroids in vascular airway remodelling in asthma and COPD. *International Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1155/2012/397693>
- Council of Europe. (2013). *European Pharmacopoeia* (8th Editio). Strasbourg Cedex: Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council.
- Culqui, X. (2017). “*DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA PLANTA Clinopodium tomentosum MEDIANTE INHIBICIÓN DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATAS Rattus norvegicus*.” Escuela Politécnica de Chimborazo.
- De la Torre, Lucía, Alarcón, D., Kvist, L. P., & Salazar, J. (2008). Usos medicinales de las plantas. In L de la Torre, H. Navarrete, P. Muriel, M. Macía, & H. Balslev (Eds.), *Enciclopedia De Plantas Utiles Del Ecuador* (1st ed., pp. 105–107). https://doi.org/10.1007/978-3-662-03237-4_3
- Dean, M., Murphy, B. T., & Burdette, J. E. (2017). Phytosteroids beyond estrogens: Regulators of reproductive and endocrine function in natural products. *Molecular*

and *Cellular Endocrinology*, 442, 98–105.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.013>

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3(4), 25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>

Dinan, L., Harmatha, J., & Lafont, R. (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00992-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00992-X)

Dumlupinar, R., Genisel, M., Erdal, S., Korkut, T., Taspinar, M. S., & Taskin, M. (2011). Effects of Progesterone, β -Estradiol, and Androsterone on the Changes of Inorganic Element Content in Barley Leaves. *Biological Trace Element Research*, 143(3), 1740–1745. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-8980-6>

Efthymiopoulos, I., Hellier, P., Ladommatos, N., Russo-Profilì, A., Eveleigh, A., Aliev, A., ... Mills-Lamprey, B. (2018). Influence of solvent selection and extraction temperature on yield and composition of lipids extracted from spent coffee grounds. *Industrial Crops and Products*, 119(September 2017), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.008>

Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., ... Eloutassi, N. (2019). Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. *Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2019/3659432>

Estrada-Reyes, R., Martínez-Vázquez, M., Gallegos-Solís, A., Heinze, G., & Moreno, J. (2010). Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.03.012>

- Fryszkowska, A., Peterson, J., Davies, N. L., Dewar, C., Evans, G., Bycroft, M., ... Holt-Tiffin, K. E. (2016). Development of a Chemoenzymatic Process for Dehydroepiandrosterone Acetate Synthesis. *Organic Process Research & Development*, 20(8), 1520–1528. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00215>
- Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., ... Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, 113, 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>
- Guan, X., Ge, D., Li, S., Huang, K., Liu, J., & Li, F. (2019). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of *Artemisia argyi* Lévl. Et vant essential oils extracted by simultaneous distillation-extraction, subcritical extraction and hydrodistillation. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24030483>
- Gunaherath, K., & Gunatilaka, L. (2014). Plant Steroids: Occurrence, Biological Significance and their Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, (Table 1), 1–26. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9931>
- Harley, R. M., & Paucar, A. G. (2000). List of species of tropical American *Clinopodium* (Labiatae), with new combinations. *Kew Bulletin*, 55(4), 917–927. <https://doi.org/10.2307/4113638>
- Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (3a ed.). Barcelona: Reverte.
- Hart, G., Gaoue, O. G., De La Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., ... Duffy, D. C. (2017). Availability, diversification and versatility explain human selection of introduced plants in Ecuadorian traditional medicine. *PLoS ONE*, 12(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184369>
- Hashemi, S., Khaneghah, A., & Sant'Ana, A. (2018). Essential Oils in Food

- Processing. In *Essential Oils in Food Processing*.
<https://doi.org/10.1002/9781119149392>
- Herrera, M., & Villegas, A. (2017). *ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL PROVENIENTE DE LA CORTEZA DE LA Ocotea quixos (Lam) Kosterm.* (Universidad Politécnica Salesiana). Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Horváth, G., & Ács, K. (2015). Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(5), 331–341.
<https://doi.org/10.1002/ffj.3252>
- INABIO. (2017). *Agenda Nacional de Investigación Sobre la Biodiversidad* (MAE, SENESCYT, & INABIO, Eds.). Quito.
- Jain, S., & Soni, V. (2012). *Bentley's Textbook of Pharmaceutics*. Elsevier.
- Janeczko, A., & Skoczowski, A. (2005). Mammalian sex hormones in plants. *FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA*, 43(2), 71–79.
<https://doi.org/10.5603/4616>
- Jayakumari, S., & Ravichandiran, V. (2017). Inhibitory effect *Terminalia chebula*, *Sida rhombifolia*, *Leucas cephalotes* on inflammatory key enzymes. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(1), 233–238.
<https://doi.org/10.5958/0974-360X.2017.00049.X>
- Jyoti Saurov, R., Sharma Baruah, P., Lahkar, L., Gurung, L., Saikia, D., & Tanti, B. (2019). Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Homalomena aromatica* Schott. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 1379–1385.

- Khan, S. W., & Khatoon, S. (2008). Ethnobotanical studies on some useful herbs of haramosh and Bugrote Valleys in Gilgit, Northern Areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 40(1), 43–58.
- Kim, E., & Goldberg, M. (1969). Serum Cholesterol Assay Using a Stable Liebermann-Burchard Reagent. 15(12), 1171–1179.
- Komsta, L., Waksmundzka-Hajnos, M., & Sherma, J. (2014). Thin-layer chromatography in drug analysis. <https://doi.org/10.1002/jps.2600511014>
- Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13–39. <https://doi.org/10.1002/ffj.2082>
- León, G., Osorio, M., & Martínez, S. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(4), 742–750.
- Luzuriaga-Quichimbo, C., Hernández del Barco, M., Blanco-Salas, J., Cerón-Martínez, C., & Ruiz-Téllez, T. (2018). Chiricaspi (*Brunfelsia grandiflora*, Solanaceae), a Pharmacologically Promising Plant. *Plants*, 7(3), 67. <https://doi.org/10.3390/plants7030067>
- Magesh, R., Poorani, R. M., Karthikeyan, V., Sivakumar, K., & Mohanapriya, C. (2015). Proportionate phytochemical screening and assessment of antioxidant potency on selected species of Lamiaceae family. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(5), 1066–1072.
- Malagón, O., Ramírez, J., Andrade, J. M., Morocho, V., Armijos, C., & Gllardoni, G. (2016). Phytochemistry and Ethnopharmacology of the Ecuadorian Flora. A Review. *Natural Product Communications*, 11(3), 297–314. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100307>

- Mesquita, L. S. S. de, Luz, T. R. S. A., Mesquita, J. W. C. de, Coutinho, D. F., Amaral, F. M. M. do, Ribeiro, M. N. de S., & Malik, S. (2019). Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. *Food Reviews International*, 35(2), 105–131. <https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1467443>
- Mohanty, S., Kamolvit, W., Zambrana, S., Sandström, C., Gonzales, E., Östenson, C. G., & Brauner, A. (2017). Extract of *Clinopodium bolivianum* protects against *E. coli* invasion of uroepithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.011>
- Morocho, V., Valle, A., García, J., Gilardoni, G., Cartuche, L., & Suárez, A. I. (2018). α -Glucosidase inhibition and antibacterial activity of secondary metabolites from the ecuadorian species *Clinopodium taxifolium* (kunth) govaerts. *Molecules*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/molecules23010146>
- MS DATA REVIEW. (2016). BRUKER Daltonics.
- National Center for Biotechnology Information. (2019). DHEA acetate.
- NIST MS Search. (2002). National institute of standards and technology.
- Noriega, P. (2009). Extracción química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. *La Granja*, 3–15.
- Noriega, P. F., Mosquera, T. de L. Á., Osorio, E. A., Guerra, P., & Fonseca, A. (2018). *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze essential oil: Chemical composition, antioxidant activity, and antimicrobial test against respiratory pathogens. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 10(9), 149–157. <https://doi.org/10.5897/jpp2017.0467>
- Noriega, P., & Taxo, A. (2018). *La flora medicinal de los parques del Distrito Metropolitano de Quito*. Quito: Abya-Yala.
- Oliveira, B., Veras, D., Betânia, M., Oliveira, M. De, Granja, F., Roberto, J., ... Lopes,

- D. S. (2020). Chemical composition and evaluation of the antinociceptive , antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto , Mansano & Azevedo) native to Brazil : A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 247(September 2019), 112265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265>
- ño Sánchez, M. F. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Aiyana.
- Pepe, G., & Albrecht, E. (2009). Steroid Endocrinology of Pregnancy. In *The Global Library of Women's Medicine*. <https://doi.org/10.3843/GLOWM.10311>
- Pergentino de Sousa, D. (2015). *Bioactive Essential Oils and Cancer* (D. P. de Sousa, Ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19144-7>
- Pires, J., Torres, P., dos Santos, D., & Chow, F. (2017). Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. *Instituto de Biociencias-Universidade de Sao Paulo*, 1–6.
- Qureshi, N. A., Qamar, M. F., Iqbal, A., Afzal, M., & Ashraf, A. (2017). Toxic potential of *Ocimum basilicum* and *Mentha piperita* (Lamiales: Lamiaceae) against *Culex quinquefasciatus* larvae (Diptera: Culicidae). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(4), 917–924. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.4711>
- Rai, V., Pai, V. R., & Kedilaya, P. (2013). A preliminary evaluation of anticancer and antioxidant potential of two traditional medicinal plants from lamiaceae- *pogostemon heyneanus* and *plectranthus amboinicus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(8), 73–78. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60811>
- Rai, Vaishali, Pai, V. R., Kedilaya, P., & Hegde, S. (2013). Research Article Preliminary Phytochemical Screening of Members of Lamiaceae Family: *Leucas*

linifolia, *Coleus aromaticus*, *Pogestemon patchouli*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21(1), 131–137.

Rivas, C., Oranday, M., & Verde, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica - Catalina Rivas-Morales, María Azucena Oranday-Cárdenas, María Julia Verde-Star - Google Libros*.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/103926.oms.313>

Rodríguez Franco, J., Pierdant Rodríguez, A. I., & Rodríguez Jiménez, E. C. (2014). *Estadística Aplicada II: Estadística en Administración para Toma de Decisiones*. México D.F: Grupo Editorial Patria.

Romani, R., Bedini, S., Salerno, G., Ascrizzi, R., Flamini, G., Echeverria, M. C., ... Conti, B. (2019). Andean Flora as a Source of New Repellents against Insect Pests: Behavioral, Morphological and Electrophysiological Studies on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Insects*, 10(6), 171.
<https://doi.org/10.3390/insects10060171>

Rondón, M., García, I., Cornejo, X., Rojas, J., & Terán, W. (2015). Phytochemical screening and antioxidant activity of seven medicinal plants species from Ecuador. *Pharmacologyonline*, 3(2015-DECEM), 19–28.

Santana de Oliveira, M., Gomes Silva, S., Neves da Cruz, J., Ortiz, E., Almeida da Costa, W., & Borges, V. (2019). Supercritical CO₂ Application in Essential Oil Extraction. In Inamuddin, R. Mobin, & A. Asiri (Eds.), *Industrial application of green solvents* (pp. 1–28). <https://doi.org/10.21741/9781644900314-1>

Scalvenzi, L., Grandini, A., Spagnoletti, A., Tacchini, M., Neill, D., Ballesteros, J. L., ... Guerrini, A. (2017). *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.) (myrtaceae) essential oil from amazonian Ecuador: A chemical characterization and bioactivity profile. *Molecules*, 22(7), 1–12.

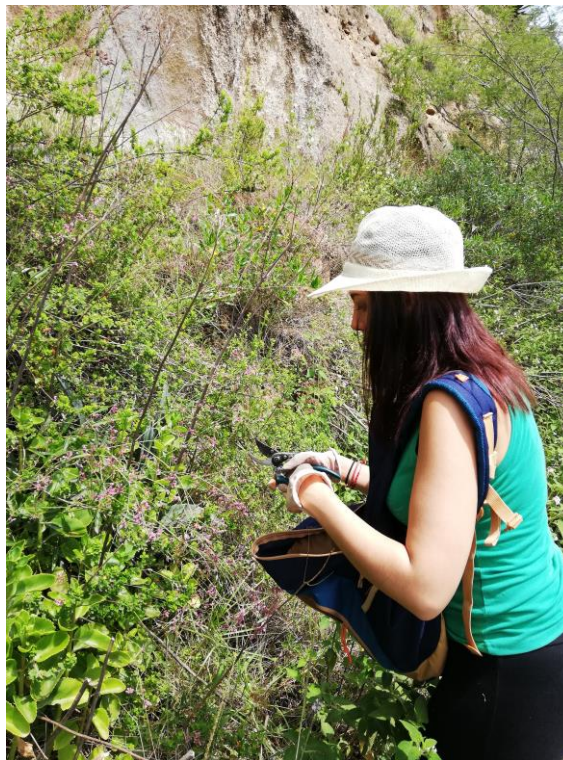
<https://doi.org/10.3390/molecules22071163>

- Sharapin, N., Rocha, L. M., & Pinzón S., R. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo.
- Shriner, R. (2013). *Identificación sistemática de compuestos orgánicos* (2nd ed.). México: Limusa-Wiley.
- Sim, L. Y., Abd Rani, N. Z., & Husain, K. (2019). Lamiaceae: An Insight on Their Anti-Allergic Potential and Its Mechanisms of Action. *Frontiers in Pharmacology*, 10(June). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00677>
- Stashenko, E., & René Martínez, J. (2019). Study of Essential Oils Obtained from Tropical Plants Grown in Colombia. In *Essential Oils - Oils of Nature [Working Title]* (p. 13). <https://doi.org/10.5772/intechopen.87199>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I.
- Tubon, I., Chiara, B., Zannoni, A., Vinueza, D., Abdo, S., & Forni, M. (2017). *EFFECTS OF ETHANOLIC EXTRACTS OF FOUR ECUADORIAN PLANTS ON PORCINE AORTIC ENDOTHELIAL CELLS (PAEC) STABILITY*. 15, 2017.
- Vázquez, A., Demmel, G. I., Cabalen, M. E., Decarlini, M. F., Criado, S. G., Aimar, M. L., ... Ruiz, G. M. (2014). Identification of volatile compounds of *Clinopodium odorum* (Lamiaceae): A comparison between HS-SPME and classic hydrodistillation. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 13(3), 285–296.
- Vera, M. (2015). Chemical Study of plants belonging to Ecuadorian flora (University of Pisa; Vol. 80). <https://doi.org/10.1055/s-0034-1394730>
- Vera, M. B., Naranjo, B. F., Malafronte, N., & Braca, A. (2014). Phenolic Compounds from *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts (Lamiaceae). *Journal of the*

- Brazilian Chemical Society*, 25(11), 2121–2124. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140181>
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Boca Raton: CRC Press.
- Waman, A. A., Bohra, P., & Sounderarajan, A. (2018). Propagule size affects yield and quality of *Curcuma mangga* Val. et Zijp.: An important medicinal spice. *Industrial Crops and Products*, 124, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.011>
- Weckmüller, H., Barriocanal, C., Maneja, R., & Boada, M. (2019). *Factors Affecting Traditional Medicinal Plant Knowledge of the Waorani, Ecuador*. 1–12.
- Wei, X. M., Cheng, J. K., Cheng, D. L., & Gao, L. M. (2004). Chemical constituents from *Clinopodium urticifolium*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 51(5 A), 1043–1049. <https://doi.org/10.1002/jccs.200400156>
- Yan-Fei, Z., Ren, F., Liu, X.-M., Lai, F., & Ma, L. (2015). Comparative analysis of essential oil composition from flower and leaf of *Magnolia kwangsiensis* Figlar & Noot. *Natural Product Research*, 6. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1113410>
- Yang, R., Xue, L., Zhang, L., Wang, X., Qi, X., Jiang, J., ... Li, P. (2019). Phytosterol contents of edible oils and their contributions to estimated phytosterol intake in the Chinese diet. *Foods*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/foods8080334>
- Zhang, Y., Jia, C., Zhang, Y., Yang, S., Dong, Y., Wei, D., ... Qin, J. C. (2019). Chemical variability in volatile composition among five species of genus *Solidago* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 84(August 2018), 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.03.006>

Anexos

Anexo 1. Recolección de *Clinopodium tomentosum*



Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 2. Triturado de partes vegetales para preparación de extracto



Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 3. Humectación de la droga vegetal



Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 4. Percolador



Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 5. Filtración de extracto



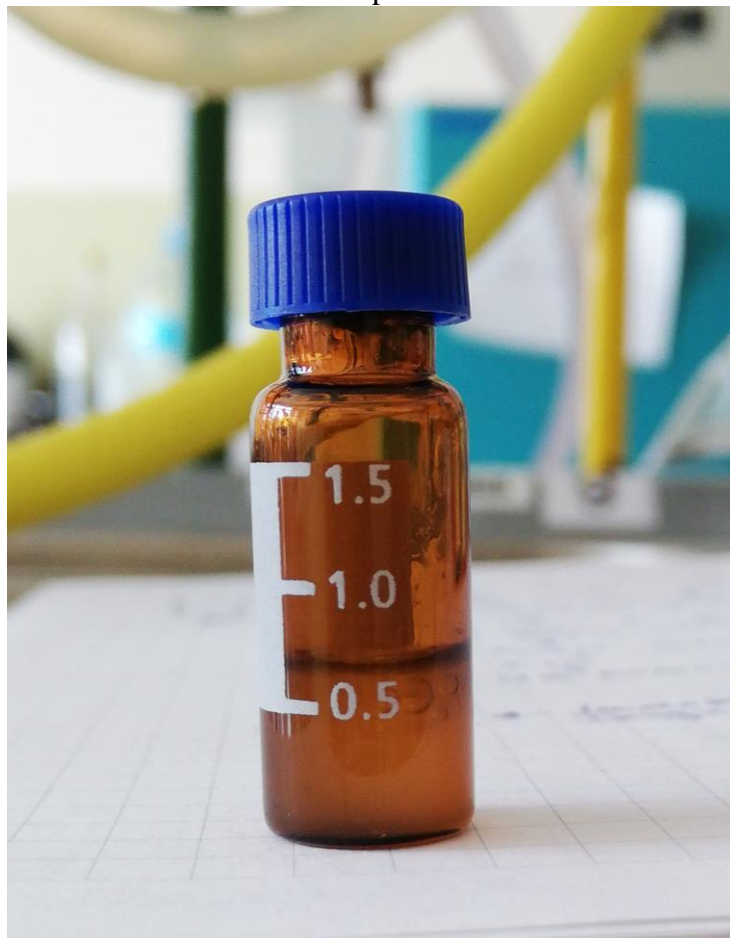
Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 6. Obtención de aceite esencial en destilador con trampa Clevenger



Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 7 Vial ámbar ANSI-48 de 2mL para almacenamiento de aceite esencial



Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 8 Estándares de colesterol.



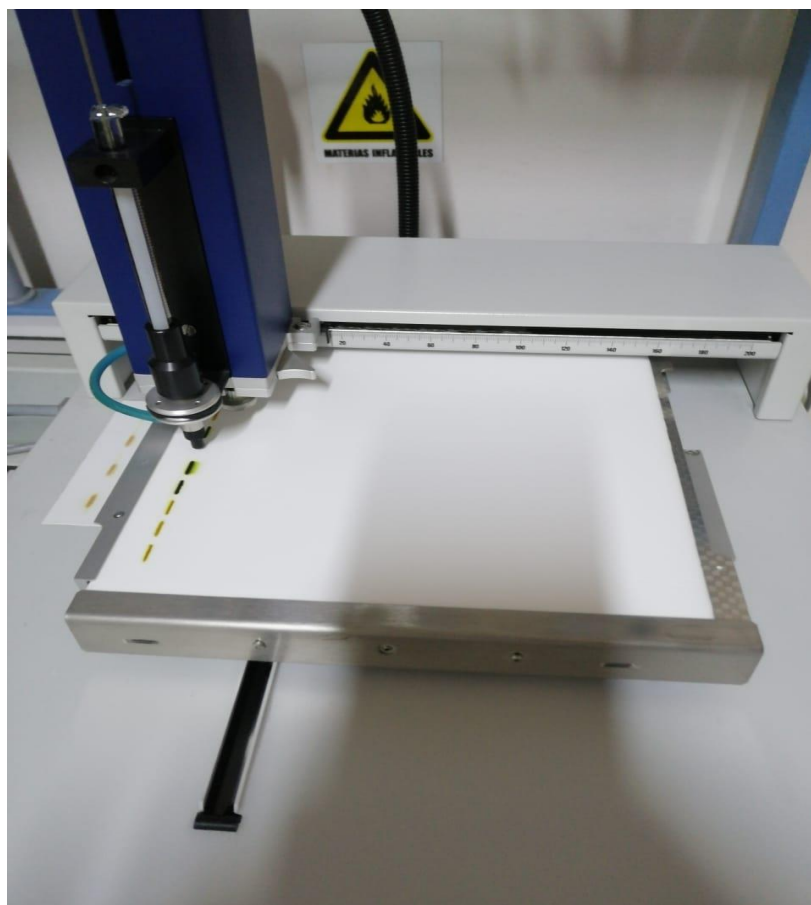
Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 9. Aplicador automático Linomat 5



Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 10. Inyección de extractos en placas cromatográficas



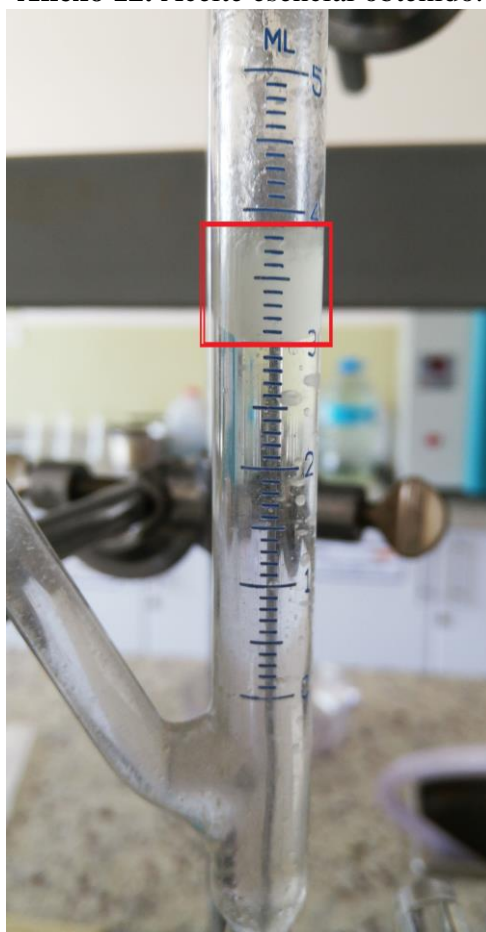
Elaborado por: La autora, 2019

Anexo 11. Elución de placas cromatográficas.



Elaborado por: La autora, 2019

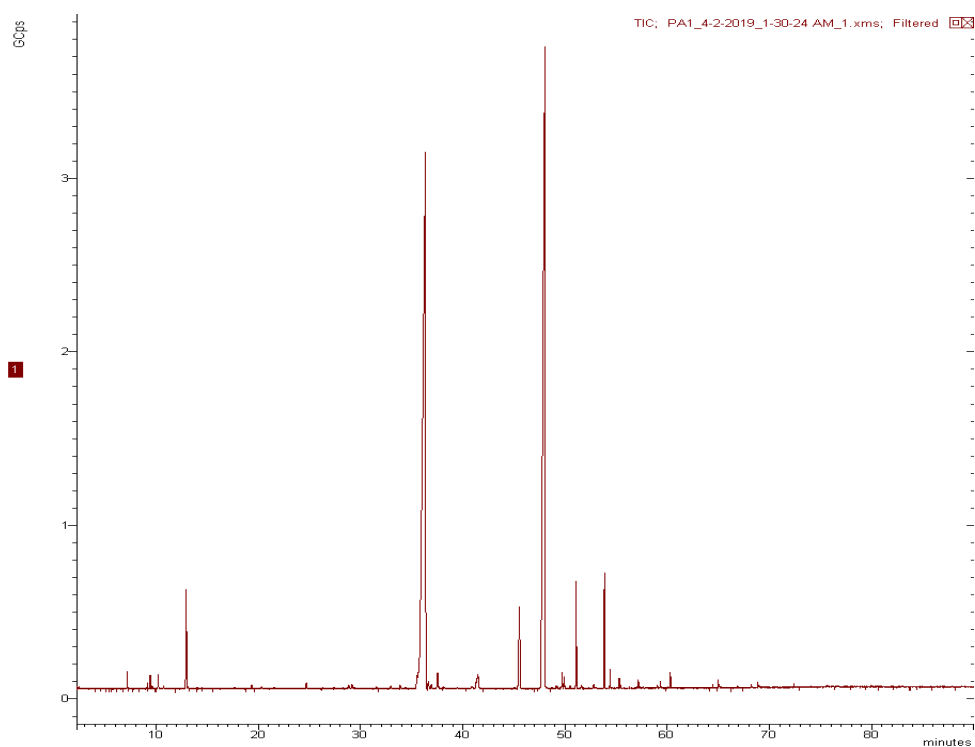
Anexo 12. Aceite esencial obtenido.



Elaborado por: La autora, 2019

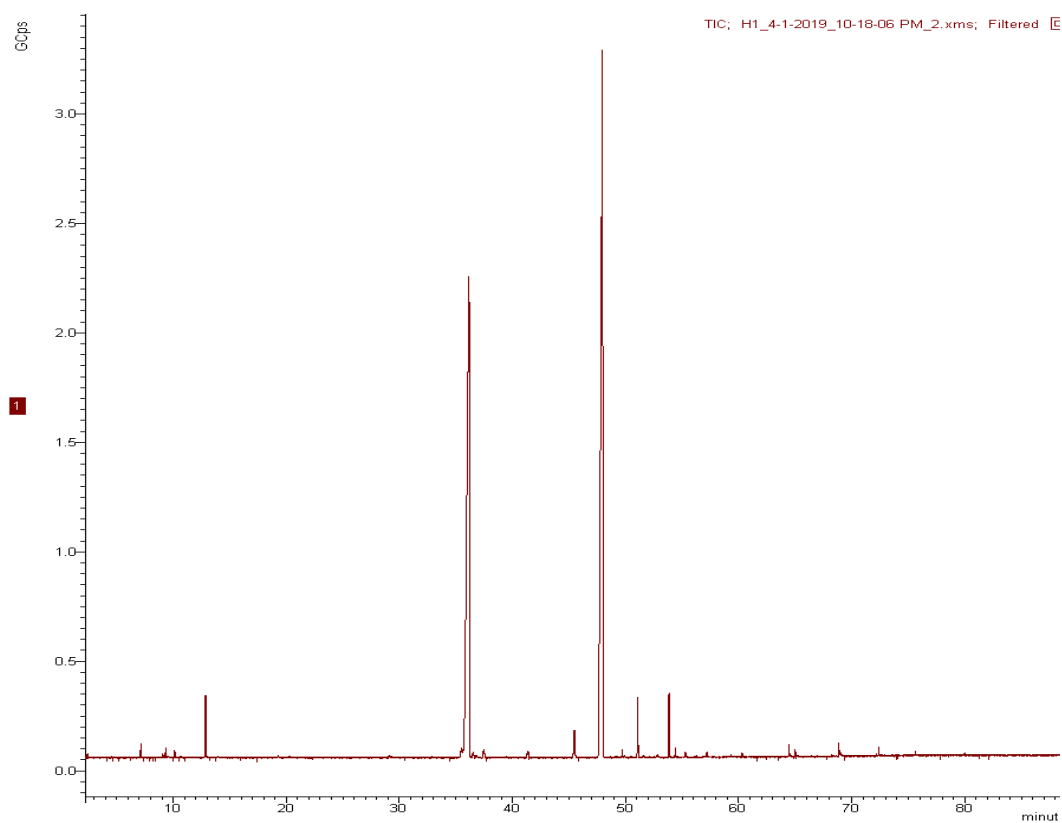
Nota: El recuadro rojo hace referencia al aceite esencial obtenido luego del proceso de hidrodestilación.

Anexo 13. Cromatograma del aceite esencial de Partes aéreas de *Clinopodium tomentosum*.



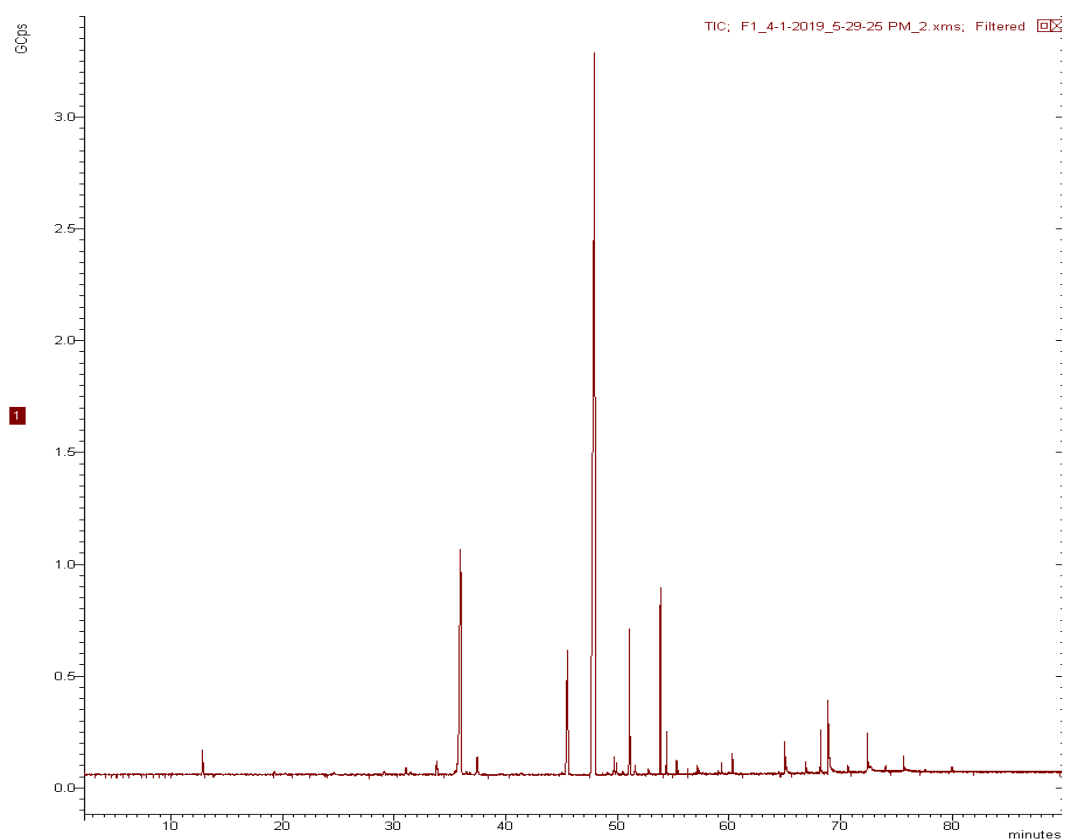
Fuente: (MS DATA REVIEW, 2016)

Anexo 14. Cromatograma del aceite esencial de hojas de *Clinopodium tomentosum*.



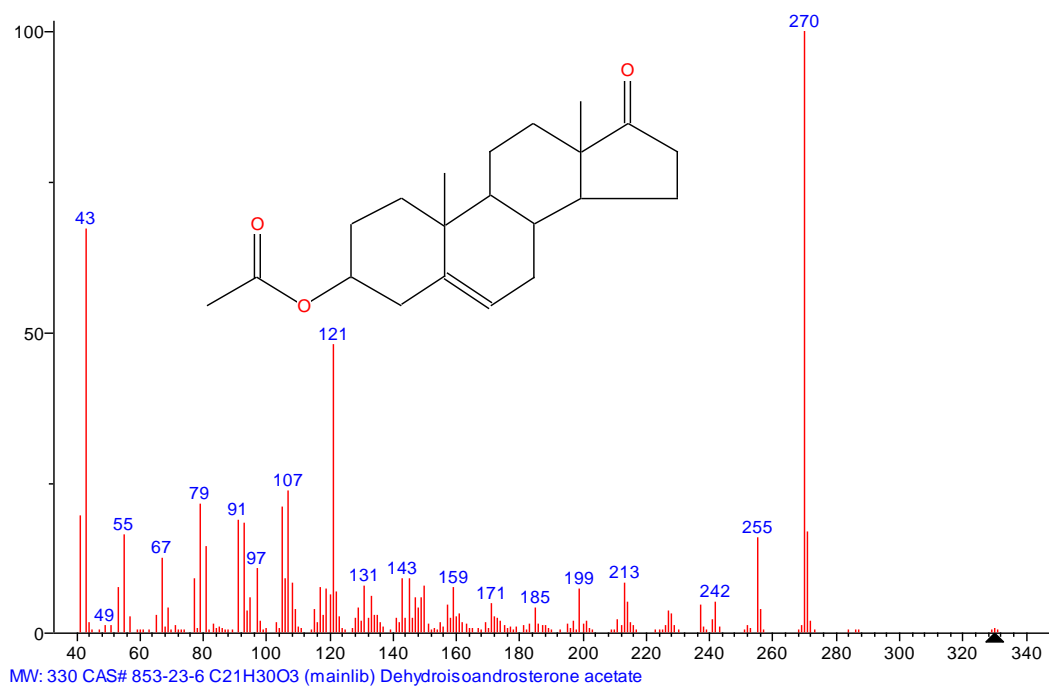
Fuente: (MS DATA REVIEW, 2016)

Anexo 15. Cromatograma del aceite esencial de flores de *Clinopodium tomentosum*.




Fuente: (MS DATA REVIEW, 2016)

Anexo 16. Espectro de masas de Acetato de dehidroepiandrosterona



Fuente: (NIST MS Search, 2002)

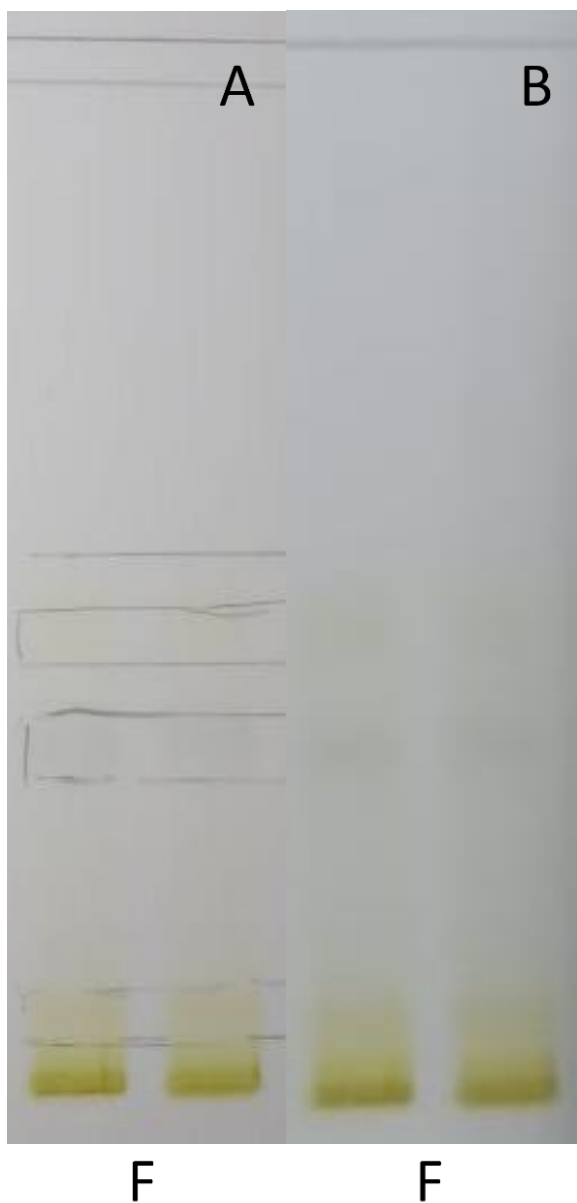
Anexo 17 Polaridad de Solventes

Solvente	Polaridad Creciente
Éter de Petróleo	
Ciclohexano	
Tetracloruro de carbono	
Benceno	
Cloruro de metileno	
Cloroformo (sin alcohol)	
Éter etílico	
Acetato de etilo	
Piridina	
Acetona	
1-propanol	
Etanol	
Metanol	
Agua	
Ácido acético	

Elaborado por: La autora, 2019.

Fuente: (Shriner, 2013)

Anexo 18. *Derivatización de extracto etanólico de flores con Liebermann-Burchard*



A) Placa cromatográfica antes de la derivatización con Liebermann-Burchard. **B)** Placa cromatográfica después de la derivatización con Liebermann-Burchard. **F:** Flores.

Elaborado por: La autora, 2019.